

Université de Montréal

Études du rôle des aldéhydes déshydrogénases de classe I dans la biosynthèse de
l'acide rétinoïque

Par

Hélène Brodeur

Département de Sciences Biomédicales

Faculté de médecine

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures en vue de

L'obtention du grade Philosophia ès Doctorat (PhD)

En sciences biomédicales

Avril 2006

©Hélène Brodeur, 2006



W

4

U58

2006

~~V.111~~

V.112

AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal

Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée

Études du rôle des aldéhydes déshydrogénases de classe I dans la biosynthèse de

l'acide rétinoïque

présentée par

Hélène Brodeur

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes

Victor Gavino, président-rapporteur

Pangala V. Bhat, directeur de recherche

Jolanta Gutkowska, membre du jury

Mark Featherstone, examinateur externe

John S. Chan, représentant du doyen de la FES

Thèse acceptée le

Sommaire

La biosynthèse de l'acide rétinoïque (AR) *in vivo* est un sujet de pointe depuis la découverte des récepteurs de l'acide rétinoïque, RAR et RXR. Il est bien connu que RAR peut lier les isoformes tout-*trans* et 9-*cis*, et que RXR ne peut lier que l'isomère 9-*cis*. Cependant, très peu de données sont disponibles sur la biosynthèse de l'AR dans les tissus. Les enzymes impliquées dans la production d'AR à partir du rétinal (RAL) sont les rétinaldéhydes déshydrogénases RALDH1, 2, 3 et 4. RALDH1 est une enzyme hautement conservée parmi les espèces, mais son patron d'expression et son activité catalytique pour les différents substrats de rétinals sont variables.

Afin de mieux étudier la synthèse de l'AR dans un système cellulaire, nous avons cloné et caractérisé une RALDH1 provenant de la lignée cellulaire JTC-12, cellules du tubule proximal de rein de singe. L'enzyme présente 98,6% d'identité avec la séquence d'acides aminés de la RALDH1 humaine et partage 85,6% et 86,2% d'identité avec les séquences des RALDH1s de rat et de souris, respectivement. Des études enzymatiques ont été effectuées sur l'enzyme purifiée. La RALDH1 de singe, comme les RALDH1s des autres espèces, catalyse les tout-*trans* et 9-*cis* RAL avec une préférence pour l'isomère 9-*cis*. Comme la RALDH1 humaine, l'enzyme peut également oxyder le rétinal 13-*cis*. Nous avons étudié la production d'AR dans les cellules JTC-12. Nous n'avons observé aucune isomérisation de l'AR dans les cellules, suggérant qu'*in vivo* il n'y a aucune activité d'isomérase et que la présence d'une isoforme provient de

l'oxydation de sa forme aldéhyde et non d'une isomérisation à partir d'un autre acide.

Il est bien établi que l'AR tout-*trans* est impliqué dans le développement en liant les RARs pour réguler la transcription de gènes. Cependant, il reste à déterminer si l'AR 9-*cis* est actif biologiquement et est impliqué dans le développement *in vivo*. Le laboratoire du Dr Bhat a généré des enzymes RALDH1s chimériques à substrats spécifiques, RALDH-131 et PB-131. Ces enzymes ont été caractérisées précédemment à partir d'extraits bactériens. Nous avons purifié les enzymes et confirmé leur activité enzymatique spécifique pour les isomères tout-*trans* (RALDH-131) et 9-*cis* (PB-131) du rétinol. Nous avons par la suite étudié, dans un modèle cellulaire, la synthèse d'AR par ces chimères. Les cellules HeLa surexprimant l'enzyme RALDH-131 ne catalysent que l'oxydation du tout-*trans* RAL et lorsque l'enzyme PB-131 est surexprimée, il n'y a oxydation que de l'isomère 9-*cis*. Ces données sont la base pour d'éventuelles études sur le métabolisme de l'AR à l'aide de souris transgéniques.

Mots clés : rétinol, acide rétinoïque, rétinolaldéhyde déshydrogénase, métabolisme des rétinoïdes, isomères

Abstract

The biosynthesis of retinoic acid (RA) has been intensively researched since the discovery of retinoic acid receptors (RAR) and retinoid X receptors (RXR). It is well known that all-*trans* and 9-*cis* RA can bind to RAR and that RXR can only bind 9-*cis* RA. However, little is known about RA biosynthesis in tissues. The enzymes involved in the production of RA from retinal are the retinaldehyde dehydrogenases RALDH1, 2, 3 and 4. RALDH1 is an enzyme highly conserved among species but with variability in its expression pattern and substrate specificity.

To study the synthesis of RA in a cellular model, we have cloned and characterized a RALDH1 from the cell line JTC-12, derived from monkey tubular proximal kidney cells. The enzyme shares 98,6% identity with the amino acid sequence of human RALDH1 and shares 85,6% and 86,2% identity with the amino acid sequence of rat and mouse, respectively. Enzymatic studies have been done on recombinant purified enzyme and the monkey RALDH1 can, as in other species, catalyze the oxidation of all-*trans* and 9-*cis* RAL with a marked preference for 9-*cis*. It can also oxidize the 13-*cis* RAL as for the human enzyme. We have studied RA production in JTC-12 cells. We did not observe any isomerisation of the RA produced suggesting there is no isomerase activity *in vivo* and that the isomer produced comes from the oxidation of the corresponding aldehyde.

It is well established that all-*trans* RA is involved in developmental processes by binding the RARs and regulating gene transcription. However, it is not clear if 9-

cis RA is effective *in vivo*. Dr Bhat's lab has previously generated chimeric RALDH1 with restricted substrate specificity, RALDH-131 and PB-131. Those enzymes had been characterized from crude bacterial extracts. Here, we have characterized the pure enzyme and confirm the previous data on their specific enzymatic activity for all-*trans* (RALDH-131) and 9-*cis* (PB-131) RAL. We have then studied the RA synthesis by these chimeras in cells. The HeLa cells overexpressing RALDH-131 oxidized only all-*trans* RAL and the cells overexpressing PB-131 were only able to catalyze oxidation of 9-*cis* RAL. These data are a good basis for future studies on RA metabolism in transgenic mice.

Key words: retinal, retinoic acid, retinaldehyde dehydrogenase, retinoid metabolism, isomers

Table des matières

IDENTIFICATION DU JURY	ii
SOMMAIRE.....	iii
ABSTRACT	v
TABLE DES MATIÈRES.....	vii
LISTE DES TABLEAUX.....	xiii
LISTE DES FIGURES	xiv
ABRÉVIATIONS.....	xvii
DÉDICACE.....	xx
REMERCIEMENTS	xxi
 CHAPITRE 1	 1
Introduction.....	2
1.1 La vitamine A	2
1.1.1 La déficience en vitamine A	5
1.1.2 L'hypervitaminose A	5
1.2 Le métabolisme de la vitamine A	6
1.3 Les protéines de transport du rétinol.....	9
1.3.1 La protéine de liaison du rétinol	9
1.3.2 Les protéines de liaison du rétinol cellulaire	11
1.3.3 Les protéines de liaison de l'acide rétinoïque cellulaire	13
1.4 L'acide rétinoïque	14
1.4.1 La présence <i>in vivo</i> des isomères 9- <i>cis</i> et 13- <i>cis</i>	15

1.5 Les enzymes impliquées dans la biosynthèse de l'AR.....	16
1.5.1 Les alcools déshydrogénases.....	16
1.5.2 Les déshydrogénases/réductases de courtes chaînes.....	18
1.5.3 Les aldéhydes déshydrogénases.....	21
1.5.3.1 Les ALDHs de classe 1.....	24
1.5.3.1.1 La RALDH1.....	27
1.5.3.1.1.1 La structure du gène de la RALDH1.....	28
1.5.3.1.1.2 La structure de la protéine de la RALDH1.....	29
1.5.3.1.1.3 L'expression de la RALDH1.....	32
1.5.3.1.1.4 L'activité enzymatique de la RALDH1.....	33
1.5.3.1.2 La RALDH2.....	34
1.5.3.1.3 La RALDH3.....	36
1.5.3.1.4 La RALDH4.....	38
1.6 Le catabolisme de l'acide rétinoïque.....	39
1.7 Les récepteurs de l'acide rétinoïque.....	41
1.7.1 Les RARs.....	44
1.7.2 Les RXRs.....	45
1.7.3 Les éléments de réponse des récepteurs à l'AR.....	47
1.8 Les effets physiologiques et pathologiques.....	48
1.8.1 La vision.....	50
1.8.2 Le cancer.....	51
1.8.2.1 La leucémie aigüe promyélocytaire.....	51
1.8.3 Le système immunitaire.....	53

1.8.4 Le développement	54
1.8.5 L'intégrité épithéliale.....	55
1.8.6 Les autres implications	56
1.9 Les hypothèses	57
1.10 Les objectifs	58
 CHAPITRE 2	59
Article 1	61
2.1 Abstract	63
2.2 Introduction.....	64
2.3 Materials and Methods.....	66
2.3.1 Chemicals and reagents.....	66
2.3.2 Cell culture.....	66
2.3.3 Northern blot analysis	67
2.3.4 Immunoblot analysis.....	67
2.3.5 Cloning of cDNA	68
2.3.6 Recombinant RALDH expression and purification	69
2.3.7 RALDH activity assays.....	69
2.3.8 Retinoid metabolism by JTC12 cells	70
2.3.9 HPLC analysis	71
2.4 Results.....	71
2.4.1 Characterization of the RALDH expressed in JTC12 cells	71
2.4.2 Kinetic properties of the recombinant JTC12 RALDH	73

2.4.3 Metabolism of retinal isomers by JTC12 cells	75
2.5 Discussion	77
2.6 Acknowledgements	82
2.7 References	82
2.8 Figure legends	87
 CHAPITRE 3	102
Article 2	104
3.1 Abstract	106
3.2 Introduction	107
3.3 Materials and Methods	108
3.3.1 Reagents	108
3.3.2 Plasmids	109
3.3.3 Expression in bacteria and enzyme purification	109
3.3.4 Assays of purified enzymes	110
3.3.5 HPLC analysis of enzymatic products	111
3.4 Results and discussion	111
3.4.1 Kinetic properties of recombinant ALDHs	111
3.5 Acknowledgements	114
3.6 References	114
3.7 Figure Legends	116

CHAPITRE 4	123
Article 3.....	125
4.1 Abstract.....	127
4.2 Introduction.....	128
4.3 Materials and Methods.....	129
4.3.1 Reagents.....	129
4.3.2 Plasmids	130
4.3.3 Enzyme assay.....	130
4.3.4 Cell culture, transient transfections and metabolic assays.....	131
4.3.5 HPLC analysis of RA metabolism.....	132
4.3.6 Western blotting.....	132
4.4 Results.....	133
4.4.1 Lack of isomerization of retinoic acid isomers in RALDH1-expressing or non-expressing cells.....	133
4.4.2 <i>In vitro</i> and <i>in vivo</i> metabolism of retinal isomers in HeLa cells transiently expressing ALDHs.....	135
4.5 Discussion.....	137
4.6 Acknowledgements.....	140
4.7 References.....	141
4.8 Figure Legends.....	145
 CHAPITRE 5	 159
Discussion.....	160

5.1 Projets futurs	164
5.1.1 La RALDH1 et le VIH.....	164
5.1.2 La cristallisation.....	165
5.1.3 L'expression des RALDHs dans les cellules cancéreuses	166
Conclusion	169
 BIBLIOGRAPHIE.....	171
ANNEXES.....	xxiii

Liste des tableaux

CHAPITRE 1

Tableau I : Expression des différentes RALDHs chez la souris 25

Tableau II : Activité des RALDHs pour les substrats de RAL. 26

CHAPITRE 2

Table I : Substrate specificities of recombinant RALDH of JTC12 cells for retinal
isomers 91

CHAPITRE 3

Table I : Kinetic parameters of purified RALDH1, RALDH-131 and PB-131...122

Liste des figures

CHAPITRE 1

Figure 1.1 : Structure chimique des rétinoïdes	3
Figure 1.2 : Implications de la vitamine A chez l'humain.....	4
Figure 1.3 : Métabolisme de la vitamine A.....	6
Figure 1.4 : Biosynthèse de l'AR.....	14
Figure 1.5 : Structure de la RALDH1 de mouton	30
Figure 1.6 : Tunnel d'entrée du substrat	31
Figure 1.7 : Régulation de gènes par l'AR via les récepteurs RAR et RXR.	41
Figure 1.8 : Récepteur à l'AR (RAR et RXR) et mécanisme d'action	43

CHAPITRE 2

Figure 2.1 : Northern analysis of total RAN and retinal-oxidizing activity in extracts from JTC12 cells and adult rat kidney	92
Figure 2.2 : Rates of RA synthesis from 9- <i>cis</i> , all- <i>trans</i> or 13- <i>cis</i> retinal with increasing protein concentrations	93
Figure 2.3 : Nucleotide and deduced amino acid sequences of the monkey RALDH1 open reading frame.....	94
Figure 2.4 : Comparison of amino acid sequences of monkey RALDH1 with other ALDH family members	95
Figure 2.5 : Expression of monkey RALDH1 in <i>E. coli</i>	96
Figure 2.6 : The pH optimum for all- <i>trans</i> RA synthesis is similar for native and recombinant monkey RALDH1	97

Figure 2.7 : Saturation kinetics of recombinant monkey RALDH1 for retinal isomers	98
Figure 2.8 : Levels of RA synthesized in JTC12 cells incubated with various concentrations of all- <i>trans</i> retinal	99
Figure 2.9 : Representative HPLC chromatograms of standard retinal isomers and their metabolites generated in JTC12 cells	100
Figure 2.10 : Biosynthesis of RA and retinol from retinal precursors in JTC12 cells	101

CHAPITRE 3

Figure 3.1 : Construction of chimeras between RALDH1 and PB-ALDH	118
Figure 3.2 : Purification of recombinant ALDHs	119
Figure 3.3 : Catalysis of RA formation from all- <i>trans</i> retinal and 9- <i>cis</i> by purified recombinant ALDHs	120
Figure 3.4 : Effects of MgCl ₂ on the all- <i>trans</i> and 9- <i>cis</i> retinal oxidation activities of ALDHs	121

CHAPITRE 4

Figure 4.1 : Selectivity of chimeric ALDHs for retinal isomers substrates	148
Figure 4.2 : Purity of the all- <i>trans</i> and 9- <i>cis</i> RA isomers used in the metabolic studies	149
Figure 4.3 : Absence of RA isomerization activity in HeLa cells	150

Figure 4.4 : Absence of RA isomerization activity in HeLa cells expressing recombinant ALDHs.....	151
Figure 4.5 : Absence of RA isomerization activity in RALDH-expressing JTC12 and HepG2 cells.....	152
Figure 4.5 (suite)	153
Figure 4.6 : Transiently expressed chimeric ALDHs are selective for retinal substrates <i>in vitro</i>	154
Figure 4.7 : Purity of standard retinal isomers used for <i>in vivo</i> RA synthesis...	155
Figure 4.8 : Conversion of retinal isomers to the corresponding RA and retinol isomers without isomerization in cultured HeLa cells expressing recombinant ALDHs.....	156
Figure 4.8 (suite)	157
Figure 4.9 : Transiently expressed chimeric ALDHs direct isomer-selective RA synthesis <i>in vivo</i>	158

Abréviations

aa : acide aminé

ADH : alcool déshydrogénase

ADN : acide désoxyribonucléase

ADN : acide désoxyribonucléase complémentaire

ALDH : aldéhyde déshydrogénase

AR : acide rétinoïque

ARN : acide ribonucléase

ARNm : acide ribonucléase messenger

ARV: anti-rétroviraux

CAR : constitutive androstane receptor

C/EBP : CCAAT/enhancer bonding protein

COUP : chicken ovalbumine upstream receptor

CRABP : cellular retinoic acid binding protein

CRAD : *cis* retinol/3 α hydroxysterol short-chain dehydrogenase

CRALBP : cellular retinal binding protein

CRBP : cellular retinol binding protein

Cys: cystéine

DBD: DNA binding domain

DMSO: dimethyl sulfoxide

DR: direct repeat

DTT: dithiothreitol

ER : esters de rétinol

GABA : acide γ -aminobutyrique

Glu: glutamine

Gly: glycine

GST : glutathione-S-transferase

HNF: hepatocyte nuclear factor

HPLC: high-pressure liquid chromatography

IP: inhibiteurs de protéase

kDa : kilodalton

kpb: kilo paire de bases

LBD: ligand binding domain

LRAT : lécithine-rétinol acyltransférase

LXR : liver X receptor

NAD(H) : nicotinamide adenine dinucleotide

NADP(H) : nicotinamide adenine dinucleotide phosphate

pb: paire de bases

PB-ALDH : phenobarbital-induced ALDH

Phe: phénylalanine

PPAR : récepteur des proliférateurs des peroxisomes

RA : retinoic acid

RAL : rétinal

RALDH : rétinal déshydrogénase

RAR : récepteur de l'acide rétinoïque

RARE : élément de réponse des RARs

RBP : retinol binding protein

RDH: rétinol déshydrogénase

RE : réticulum endoplasmique

ROL : rétinol

RT-PCR : reverse transcriptase-polymerase chain reaction

RXR : récepteur des rétinoïdes X

RXRE : élément de réponse des RXRs

SDR : short-chain dehydrogenases/reductases

SDS-PAGE : sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis

TR : récepteur à l'hormone thyroïdienne

TTR : transthyrétine

UGT : UDP-glucuronosyl-transferase

VDR : récepteur à la vitamine D3

VIH : virus de l'immunodéficience humaine

À Toi,

À Sylvie, c'est un peu le tien.

Remerciements

Je tiens à remercier tous ceux et celles qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail, mais tout spécialement

Le Dr Bhat, mon directeur de recherche, qui m'a accueilli dans son laboratoire et m'a permis d'approfondir mes connaissances, d'apprendre de nouvelles techniques dont le HPLC et la gestion d'un laboratoire.

Le Dre Mader, pour son expertise et ses collaborations, ainsi que le personnel de son labo mais particulièrement Anick Auger, Samuel Chagnon et Maxime Parisotto.

Le Dr Toma, pour son expertise et ses conseils de même que ses collaborations.

Je tiens à remercier chaleureusement les personnes qui travaillent ou ont travaillé, durant mon séjour, dans le labo 7-026 et avec qui j'ai partagé des moments inoubliables comme des gâteaux, des fous rires, des pas de danse, des échanges scientifiques et aussi des périodes de malchance. Un gros merci à Dominic Devost, Nina N'Diaye, Isabelle Gagnon, Sonia Deschênes, Valérie Baldacchino, Maude Loignon et Sylvie Oble.

Je veux remercier certaines personnes du centre de recherche qui sont toujours un peu dans l'ombre mais sans leur présence et leur travail, beaucoup de choses ne pourraient être. Merci à Viviane, Alain et Régis.

Je tiens à remercier ma famille qui tout au long de mes études m'a appuyée, encouragée, essayée de comprendre ce que je faisais, elle a été d'une grande patience. Merci à mes parents Colette et Jacques, ma sœur Carole, mes frères Luc et Marc, ma belle-sœur Mylenn ainsi que mes neveux et nièces Vanessa, Anthony, Valérie, Guillaume et Tommy. Et mon oncle Jocelyn qui a toujours cru en moi.

Un merci spécial à Sylvie qui a été une présence de grande valeur depuis le début. Merci pour ton amitié, tes conseils techniques, ta confiance et ta patience. On a la même chance, on se comprend.

Finalement, je tiens à remercier mon conjoint Paul. Ton amour, ta patience, ta détermination, ton sourire, tes encouragements et ta présence m'ont permis de me rendre jusqu'au bout. Je t'aime très beaucoup fort.

It's supposed to be easy.

CHAPITRE 1

Introduction

La vitamine A est un métabolite essentiel à l'organisme, impliqué dans plusieurs processus allant de la reproduction et le développement, à la vision, en passant par le système immunitaire et la régénération épithéliale. Le principal élément actif de la vitamine A est l'AR qui peut lier les récepteurs RAR et RXR afin de réguler la transcription de gènes. L'acide rétinoïque est produit à partir du rétinol, suite à deux étapes oxydatives. La première oxydation est réversible et catalysée par des enzymes des familles alcool déshydrogénases et déshydrogénases/réductases à courtes chaînes. La deuxième oxydation est irréversible et catalysée par les aldéhydes déshydrogénases. La grande famille des aldéhydes déshydrogénases comprend une classe spécifique d'enzymes qui catalysent l'oxydation du rétinol en acide rétinoïque, ce sont les rétinaldéhydes déshydrogénases dont fait partie l'enzyme RALDH1.

1.1 La vitamine A

Dans l'ancienne Égypte, le syndrome de perte de vision nocturne était traité par l'ingestion d'huile de foie de morue (Moore, 1957). Maintenant, il est connu que ce syndrome découlait d'une déficience en vitamine A. La prise d'huile de foie de morue, très riche en vitamine A permettait de traiter le syndrome. La vitamine A a d'abord été identifiée comme une substance liposoluble importante pour la croissance des rats (McCollum et Davis, 1913). En 1931, Karrer et coll. ont déterminé la structure chimique du rétinol (ROL). Par la suite, plusieurs aspects

de la vitamine A comme sa structure, ses propriétés physico-chimiques, son métabolisme, sa physiologie ainsi que sa synthèse n'ont pas cessé d'être étudiés.

La structure chimique de la vitamine A comprend un cycle β -ionone, une queue isoprénoïde et un groupement polaire terminal qui varie selon l'état d'oxydation de la molécule, un groupement hydroxyle pour le rétinol (ROL), aldéhyde pour le rétinal (RAL) et carboxyle pour l'acide rétinoïque (AR) (Figure 1.1). La conformation de la queue isoprénoïde donne des composés isomères ayant les mêmes propriétés chimiques, mais elle affecte la polarité de la molécule et l'absorbance optique. Les isomères les plus connus sont le tout-*trans*, le 9-*cis*, le 11-*cis* et le 13-*cis*. Les rétinoïdes sont sensibles à la lumière et à la chaleur qui peuvent affecter la stabilité de la molécule et conduire à son isomérisation en isomère plus stable.

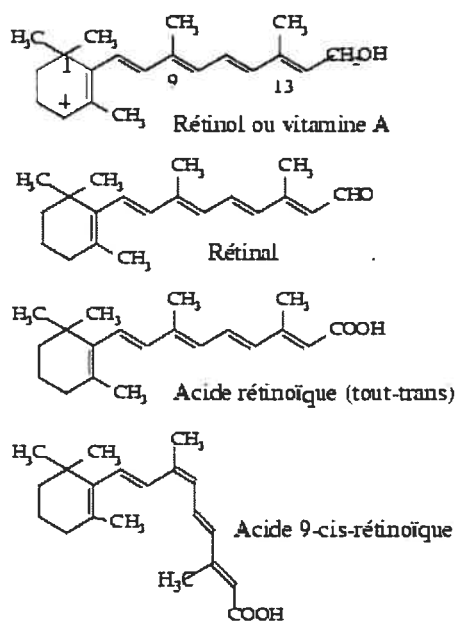


Figure 1.1 : Structure chimique des rétinoïdes (www.pharmacorama.com)

Le terme vitamine A comprend les molécules autres que les caroténoïdes qui possèdent une activité biologique, tandis que le terme rétinoïde comprend les dérivés, naturels ou synthétiques, du ROL ayant ou non une activité biologique (Sporn et coll., 1984). Les implications de la vitamine A sur l'organisme sont nombreuses et variées (Figure 1.2). Les rétinoïdes sont impliqués dans le développement de l'embryon (Ross et coll., 2000) ainsi que dans la différenciation cellulaire (Rosenthal et coll., 1994). On retrouve aussi des effets de la vitamine A dans le système immunitaire (Ross et coll., 1994), la régénération des tissus épithéliaux de divers organes (McCullough et coll., 1999), le traitement de certains cancers (Lotan, 1996) et bien sûr la vision (Saari, 1999). Une carence ou un excès en vitamine A peut avoir des conséquences néfastes sur l'organisme. Une régulation de l'homéostasie des rétinoïdes est donc essentielle.

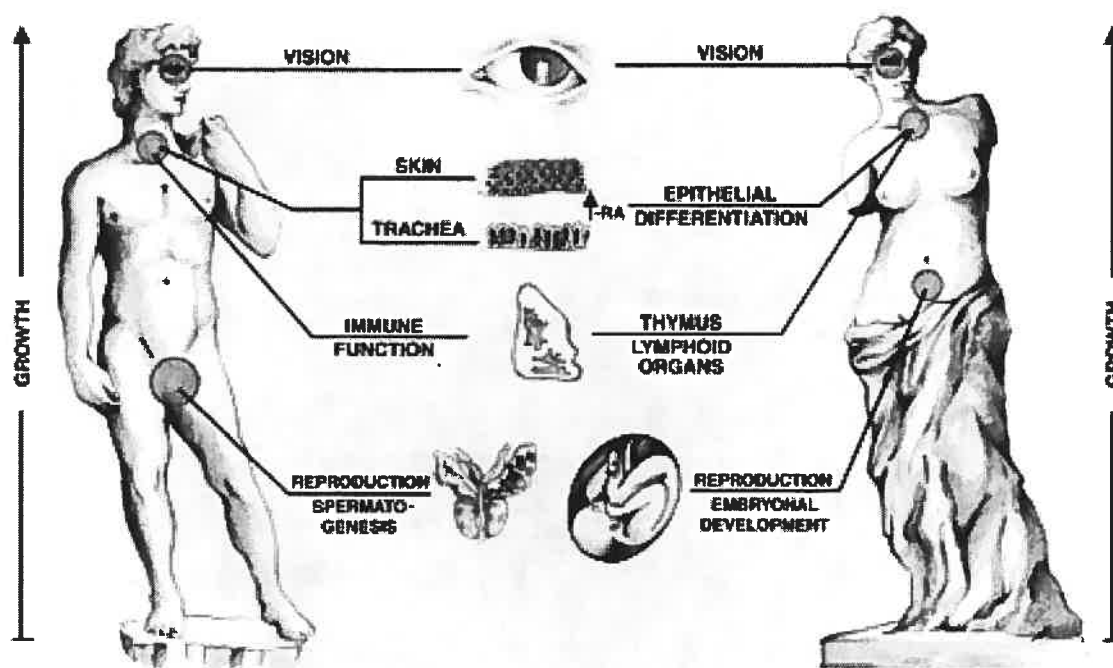


Figure 1.2 : Implications de la vitamine A chez l'humain (Ross et coll., 2000).

1.1.1 La déficience en vitamine A

La déficience en vitamine A constitue un problème mondial de santé, particulièrement chez les enfants d'Asie, d'Amérique du sud et d'Afrique où l'alimentation est pauvre en carotène. Cette carence se traduit surtout par des troubles de la vision nocturne. La xérophtalmie, une conséquence du manque de vitamine A, est utilisée comme marqueur de cette carence (McLaren and Frigg, 2002). Le système immunitaire est aussi diminué par une carence en vitamine A. La mortalité suite à la rougeole est plus marquée dans les pays où le manque de vitamine A est flagrant. Une hypovitaminose A entraîne, chez le fœtus, des malformations au niveau des systèmes cardiovasculaire, respiratoire, uro-génital, des membres et du cerveau. Lorsque la déficience est extrême, il peut même y avoir mort de l'embryon.

1.1.2 L'hypervitaminose A

À l'inverse, un excès de vitamine A a aussi de graves conséquences sur l'organisme. Ce problème affecte plus particulièrement la population nord-américaine où les suppléments vitaminiques sont disponibles. Chez l'embryon, l'hypervitaminose aura des effets tératogènes affectant les membres, les structures crânio-faciales et le cœur. Chez l'enfant et l'adulte, l'excès de vitamine affectera la pression du liquide céphalo-rachidien entraînant de la fatigue, des maux de tête et de la fièvre.

1.2 Le métabolisme de la vitamine A

La vitamine A provient de plusieurs sources alimentaires. Chez les animaux supérieurs comme l'homme, les rétinoïdes proviennent de la diète et ne peuvent être synthétisés *de novo*. La vitamine A est retrouvée notamment chez les végétaux sous forme de caroténoïdes possédant une activité de provitamine A, tandis que chez les animaux, elle se présente sous forme d'esters de rétinol (ER), d'un peu de ROL et en moindre quantité d'AR. Le métabolisme de la vitamine A est un processus complexe comprenant l'ingestion, l'emmagasiner, l'oxydation en métabolites actifs et l'élimination (Figure 1.3).

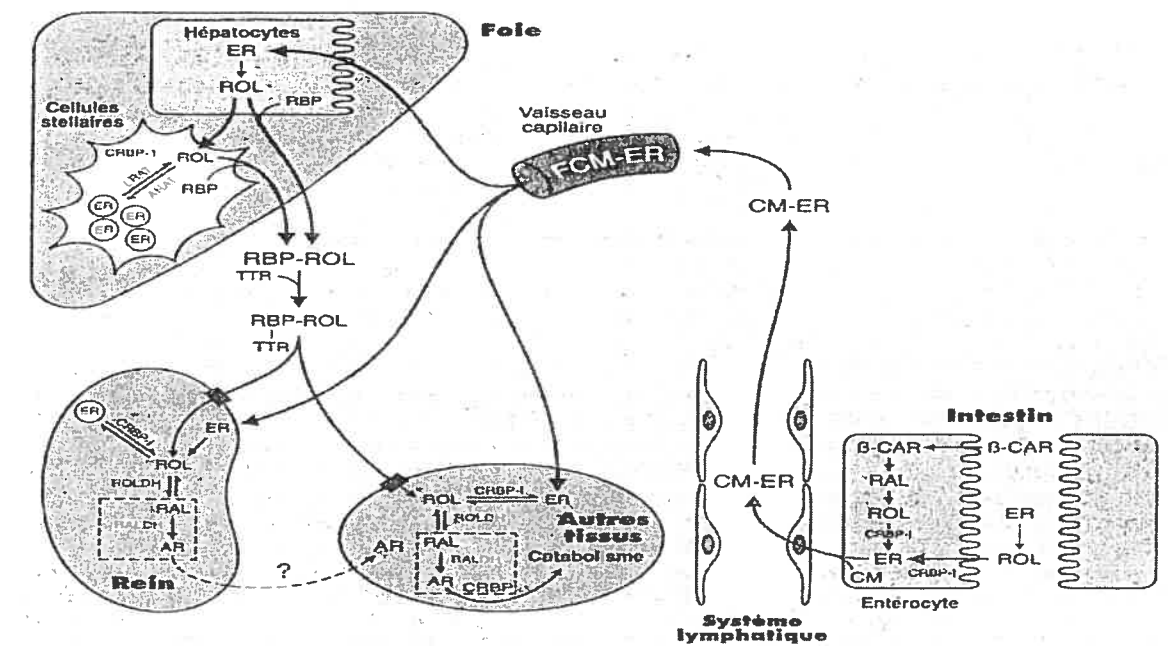


Figure 1.3 : Métabolisme de la vitamine A (Labrecque et coll., 1997)

Une fois ingérés, les rétinoïdes d'origine végétale sont absorbés directement dans le duodénum où ils sont oxydés par l'enzyme carotène-15,15'-dioxygénase pour donner deux molécules de rétinol, réduites à leur tour par une rétinaldéhyde réductase pour former le ROL (During et coll., 1998). Les esters de rétinol d'origine animale sont hydrolysés en ROL par une rétinyl-ester hydrolase (Labrecque et coll., 1997). Le ROL, ingéré ou nouvellement produit, est estérifié dans les entérocytes par l'enzyme lécithine-rétinol acyltransférase (LRAT) (Collins et Mao, 1999). Il y a empaquetage des ER dans les chylomicrons qui sont acheminés au foie par le système lymphatique. Dans le foie, des enzymes rétinyl-ester hydrolases transforment les ER de nouveau en ROL, qui est ensuite emmagasiné dans les cellules stellaires hépatiques (cellules Ito) sous forme d'ER dans des gouttelettes lipidiques. Le ROL est recyclé de sept à 13 fois, c'est-à-dire hydrolysé, sécrété, estérifié, emmagasiné, avant son utilisation finale. Lorsque sécrété dans la circulation, le ROL est lié à la « retinol-binding protein » (RBP) et associé à la protéine transthyréline (TTR) (Labrecque et coll., 1997). La TTR servirait à prévenir la filtration glomérulaire du complexe ROL-RBP. Le complexe ROL-RBP-TTR est internalisé dans les cellules cibles (Collins et Mao, 1999). Le processus par lequel le rétinol traverse la membrane cytoplasmique n'a pas encore été élucidé. Deux mécanismes sont proposés, un récepteur membranaire reconnaissant le complexe ROL-RBP-TTR pourrait intervenir dans l'internalisation, ou encore il y aurait diffusion du rétinol à travers la membrane cellulaire (Gottesman et coll., 2001). Dans les tissus cibles, il y a production d'une forme active de la vitamine A, l'acide rétinoïque. Deux étapes d'oxydation

sont requises pour obtenir de l'AR à partir de rétinol. La première étape est réversible et fait intervenir certains membres de la famille des alcools déshydrogénases, les rétinol déshydrogénases (RDH) (Duester, 2000). La seconde réaction enzymatique est irréversible et catalysée par les rétinaldéhydes déshydrogénases (RALDH), membres de la grande famille des aldéhydes déshydrogénases (Duester, 2000). L'AR peut, une fois synthétisé, être utilisé comme ligand des RAR et RXR. Une fois lié à des protéines cellulaires, le rétinol et ses dérivés, le rétinal et l'AR, deviennent solubles (Gottesman et coll., 2001). Ces molécules sont les « cellular retinol-binding protein » (CRBP), type I et II, et les « cellular retinoic acid-binding protein » (CRABP), type I et II. Cette association avec une protéine leur permet également d'être un substrat de plus haute affinité pour les enzymes impliquées dans la production d'AR (Collins et Mao., 1999). Plusieurs effets pathologiques sont associés avec une trop grande ou une trop faible quantité d'AR (calcification des tissus mous, toxicité et xérophtalmie, immunodéficience, respectivement) d'où l'importance d'une régulation précise de la production d'AR (Collins et Mao, 1999). La dégradation de l'AR en métabolites polaires est primordiale. Des hydrolases CYP 26, de la famille des cytochromes P450, catalysent l'oxydation de l'AR en composés hydrosolubles, les 4-hydroxy AR, 4-oxo AR et 18-hydroxy AR (White et coll., 1996). À l'aide de l'enzyme UDP-glucuronosyl-transférase (UGT), l'AR est également conjugué à un acide glucuronique hydrophilique permettant ainsi la détoxification de l'AR et son élimination (Gestl et coll., 2002). Cependant, les dérivés glucuroniques de l'AR sont aussi des métabolites actifs de la vitamine A.

Il est important de souligner qu'ils ne sont pas toxiques et n'ont pas d'effet tératogène sur l'organisme (Barua, 1997).

1.3 Les protéines de transport des rétinoïdes

Il existe plusieurs protéines impliquées dans le transport des rétinoïdes, autant au niveau intracellulaire qu'intercellulaire dans le plasma. Le ROL est couplé à la « retinol-binding protein » (RBP) pour son transport dans le sang jusqu'aux cellules cibles. Dans les cellules, le ROL, le RAL et l'AR vont se lier à des protéines cellulaires qui les solubilisent, augmentant leur affinité comme substrat (McLaren et Frigg, 2002). Elles jouent aussi un rôle de protection en liant le ROL libre car ce dernier, en excès, peut déstabiliser la structure membranaire et affecter sa fonction (Blomhoff, 1994). Ces protéines sont les « cellular retinol-binding protein » (CRBP), de type I et II, et les « cellular retinoic acid-binding protein » (CRABP), de type I et II (Gottesman et coll., 2001). Elles font partie d'une famille, hautement conservée chez les mammifères, de protéines cytosoliques liant de petits ligands hydrophobiques comme les rétinoïdes (Ong et coll., 1994).

1.3.1 La protéine de liaison du rétinol

La « retinol-binding protein » (RBP) est une protéine qui lie le ROL dans le foie pour son transport dans le plasma jusqu'aux cellules cibles, c'est le seul

transporteur spécifique dans la circulation (Gottesman et coll., 2001). Elle a un poids moléculaire de 21 kDa et sa structure comprend une longue chaîne polypeptidique contenant un site de liaison pour le rétinol (Collins et Mao, 1999). La RBP, couplée à la transthyrétine, est synthétisée dans le foie où elle lie le ROL pour ensuite l'acheminer aux cellules. Ce complexe RBP-ROL-TTR, de 80 kDa, sert principalement à éviter la filtration glomérulaire du RBP-ROL. La RBP est capable de solubiliser le ROL grâce à sa poche hydrophobe. Des souris déficientes en RBP ont été générées. Ces souris transgéniques sont viables et fertiles, mais leur niveau de rétinol dans le sang est plus bas et leur réserve dans le foie plus élevée. A leur naissance, elle souffrent également de troubles de la vision pendant quelques mois (Quadro et coll., 1999). Une étude chez des sœurs ayant une mutation dans le gène RBP, ainsi que des niveaux sanguins très faibles en RBP, a mis en évidence, chez ces personnes, des troubles de vision nocturne sans aucun autre symptôme associé à une déficience en vitamine A (Seeliger et coll., 1999). Il semblerait, selon les études réalisées chez la souris et l'humain, que la RBP serait essentielle pour la mobilisation du ROL dans le foie lorsque la diète est insuffisante en vitamine A (Noy, 2000). D'autres mécanismes approvisionneraient les cellules en rétinoïdes de différentes formes. Ces différentes formes sont : 1) l'AR libre dans la circulation, 2) les ER dans les chylomicrons et dans les fantômes de chylomicrons, 3) les métabolites polaires glucuroniques du rétinol et de l'AR, et 4) les provitamines A comme les caroténoïdes qui peuvent être convertis directement dans les tissus en rétinol ou en acide rétinoïque (Gottesman et coll., 2001).

1.3.2 Les protéines de liaison du rétinol cellulaire

Les « cellular-retinol binding proteins » (CRBP) I et II partagent 56% d'identité et peuvent interagir avec le tout-*trans* ROL et le tout-*trans* RAL (Noy, 2000). CRBP I a cent fois plus d'affinité pour le ROL que CRPB II et leur affinité pour le RAL est similaire (Noy, 2000). Leur distribution tissulaire est spécifique à chacune des protéines (Noy, 2000). La CRBP de type I est exprimée dans plusieurs tissus, autant chez l'embryon que chez l'adulte (Ghyselinck et coll., 1999), avec une abondance particulière dans le foie, les reins, les poumons et les organes reproducteurs (Noy, 2000). En ce qui concerne la CRPB II, son expression chez l'adulte se limite au petit intestin dans les entérocytes matures des villosités de l'épithélium mucosal. Chez l'embryon, elle est présente dans l'intestin, mais aussi dans le foie, de manière transitoire (Noy, 2000). La CRBP I a plusieurs fonctions, elle présente le rétinol à l'enzyme LRAT pour l'estérification de la vitamine A, solubilise les rétinoïdes, favorise l'oxydation du rétinol et du rétinal par les rétinol déshydrogénases et les rétinal déshydrogénases, respectivement (Collins et Mao, 1999). Elle semblait essentielle au métabolisme du rétinol jusqu'à l'étude de souris déficientes pour ce gène. Les souris mutantes sont viables, fertiles, leur espérance de vie est normale et elles ne démontrent aucune anomalie caractéristique d'une déficience en AR lors de la vie embryonnaire (Ghyselinck et coll., 1999). Cependant, une réduction notable est observée dans les réserves d'esters de rétinol du foie. Cette diminution serait due au fait que l'estérification du rétinol par l'enzyme LRAT n'est pas aussi efficace

avec le rétinol libre qu'avec le rétinol lié au CRBP I (Ghyselinck et coll., 1999). Les souris avec une diète suffisante en vitamine A ne présentent pas de symptômes dus à une hypovitaminose A, contrairement à celles dont la diète est déficiente en vitamine A. Ces dernières écoule leur réserve d'ER au bout de cinq mois et développent par la suite des anomalies caractéristiques d'un hypovitaminose A post-natale (Ghyselinck et coll., 1999). Il est à noter que le développement normal des souris mutantes n'est pas dû à une redondance de l'expression de CRBP II puisque le patron d'expression tissulaire de la protéine CRBP II est le même pour les souris sauvages et mutantes (Ghyselinck et coll., 1999). La seule différence est le niveau d'expression de CRBP II, plus élevé dans certaines cellules, probablement à cause d'une induction de la transcription du gène de CRBP II par l'AR et le gène $RAR\beta 2$ (Ghyselinck et coll., 1999). La forte présence de CRBP II dans les intestins suppose que la protéine serait principalement impliquée dans les étapes initiales de l'absorption de la vitamine A. D'ailleurs le complexe CRBP II-ROL, comme CRBP I-ROL dans le foie, serait un substrat de haute affinité pour l'enzyme LRAT, lors de l'estérification du ROL, comparativement au ROL libre (Noy, 2000). Ces deux CRBPs jouent un rôle clé dans la présentation du ROL et du RAL, en limitant l'accès aux enzymes essentielles du métabolisme de la vitamine A.

1.3.3 Les protéines de liaison de l'acide rétinoïque cellulaire

Les « cellular-retinoic acid binding proteins » (CRABP) de type I et II sont exprimées aux niveaux embryonnaire et adulte dans plusieurs tissus (Gottesman et coll., 2001). Néanmoins, les patrons d'expression spatiotemporaux sont spécifiques pour chaque protéine et ne se recoupent pas (Gorry et coll., 1994). Leur structure est très bien conservée à travers les espèces laissant présager des fonctions essentielles chez les vertébrés (Gorry et coll., 1994). Il est suggéré que ces protéines tamponneraient le taux d'AR libre intracellulaire en le séquestrant, en modulant son catabolisme, afin de maintenir des concentrations tolérables pour l'organisme (Gorry et coll., 1994). Elles seraient aussi impliquées dans le transfert de l'AR du cytoplasme aux récepteurs nucléaires. Pour déterminer leur rôle physiologique, des souris déficientes en CRABP I, CRABP II ou les deux ont été générées. Dans les trois modèles de souris mutantes, les homozygotes sont phénotypiquement normaux (Gorry et coll., 1994 ; Lampron et coll., 1995). Les animaux ont un développement embryonnaire et post-natal normal, sont fertiles et ont une espérance de vie normale. Il n'y a pas de redondance entre CRABP I et II ou une autre protéine encore inconnue, car le double mutant est normal et aucune activité supplémentaire de liaison à l'AR n'a été détectée dans le double mutant (Lampron et coll., 1995). Ces protéines sont tellement bien conservées dans l'évolution qu'elles ont un rôle important à jouer dans le métabolisme de la vitamine A, mais il est probable qu'il n'a pas pu être détecté à cause de l'environnement facilité et surprotégé dans lequel les animaux de laboratoire

vivent, ou encore, qu'il n'apporte qu'un mince avantage de viabilité (Lampron et coll., 1995).

1.4 L'acide rétinoïque

L'AR est obtenu à la suite de deux oxydations de la vitamine A (Figure 1.4). La première étape, réversible, est l'oxydation du rétinol en rétinol. La deuxième oxydation est irréversible et permet la production d'AR à partir du rétinol.

Il existe plusieurs isoformes de l'AR, les plus connues étant l'acide rétinoïque tout-*trans*, 9-*cis* et 13-*cis*. Les isoformes tout-*trans* et 9-*cis* (Figure 1.1, page 3) sont d'ailleurs les ligands des récepteurs RAR et RXR. C'est grâce à ces récepteurs que l'AR a un effet sur la régulation des gènes.

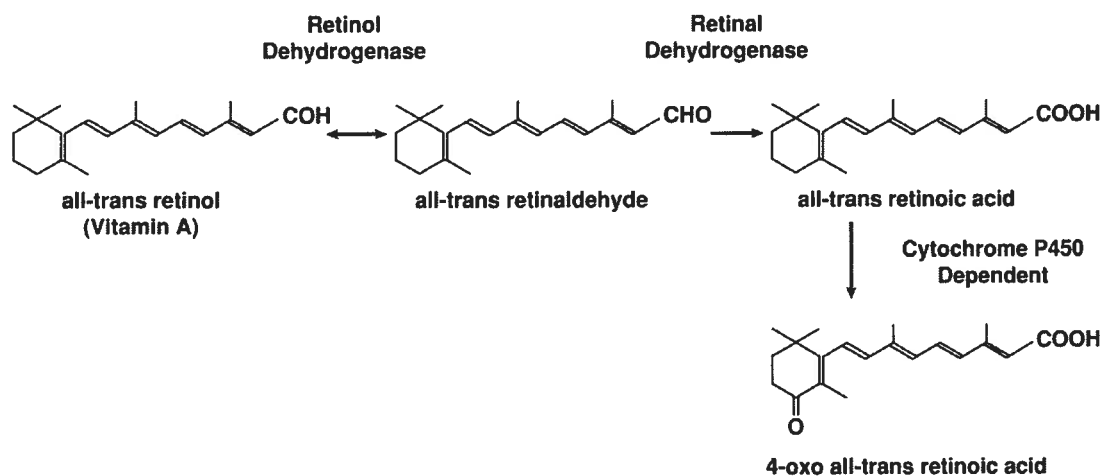


Figure 1.4 : Biosynthèse de l'AR (Ross et coll., 2000)

1.4.1 La présence *in vivo* des isomères 9-*cis* et 13-*cis*

Il y a controverse au sujet de la présence *in vivo* de certains isomères des rétinoïdes comme l'AR 9-*cis*. Heyman et coll. (1992) ont démontré la présence d'AR 9-*cis* dans des extraits de foie et de reins de souris adultes, pouvant se lier au récepteur RXR. Une autre étude sur des embryons de souris n'a pas détecté d'AR 9-*cis in vivo* (Horton et Maden, 1995). Selon la première étude (Heyman et coll., 1992), l'AR 9-*cis* produit proviendrait de l'isomérisation de l'AR tout-*trans*. Des études d'isomérisation ont été faites et il semblerait que l'isomérisation de l'AR tout-*trans* en 9-*cis* et 13-*cis* serait un processus chimique dépendant d'un thiol et ne serait en aucun cas due à l'action d'une isomérase (Urbach et Rando, 1994a, 1994b). Différentes études supportent l'hypothèse qu'il n'y a pas d'isomérisation des rétinoïdes (Brodeur et coll., 2003 ; Kraft et coll., 1995 ; Sass et coll., 1999 ; Liu et coll., 1996) et plusieurs enzymes clonées sont capables de catalyser l'oxydation des isomères 9-*cis* et 13-*cis* du ROL et du RAL (Duester, 2000), ce qui suggère qu'une voie de synthèse de ces isomères existerait *in vivo*. Une étude récente de Lidén et Eriksson (2005) suggère la présence d'une isomérase qui isomériserait l'ER tout-*trans* en ROL 9-*cis*, donc avant la première oxydation de la synthèse de l'AR.

L'AR 13-*cis* est présent dans le plasma humain (Eckhoff et Nau, 1990) et il jouerait un rôle de réservoir pour l'AR tout-*trans* en s'isomérisant en cet isomère (Armstrong et coll., 2005). Il semblerait, cependant, que cet AR aurait d'autres

fonctions, car les effets tératogènes observés en cas d' excès d'AR 13-*cis* ne sont pas tous dus à son isomérisation en tout-*trans* (Nau, 2001).

Plusieurs études montrent que les AR 9-*cis* et 13-*cis* sont actifs biologiquement (Blaner, 2001 ; Gottardis et coll., 1996). Il est donc très probable que des voies de biosynthèse existent pour ces isomères comme pour l'AR tout-*trans*.

1.5 Les enzymes impliquées dans la biosynthèse de l'AR.

Plusieurs familles d'enzymes sont impliquées dans la production d'AR à partir du rétinol. Ce sont des enzymes hautement conservées entre les espèces et provenant souvent d'un gène ancestral commun, laissant présager l'importance de ces enzymes, probablement, dans la détoxification des rétinoïdes.

1.5.1 Les alcools déshydrogénases

Les alcools déshydrogénases (ADH) sont impliquées dans l'oxydation NAD-dépendante d'alcools en leur aldéhydes correspondant, comme le rétinol en rétinol et l'éthanol en acétaldéhyde. Ce sont des enzymes cytosoliques dépendantes du zinc avec une sous-unité d'environ 40 kDa (Duester, 2000). Comme la première étape d'oxydation est une étape réversible, ces enzymes peuvent également catalyser une réduction NADH-dépendante. Dans les conditions physiologiques où le ratio NAD/NADH est d'environ 1000, on retrouve seulement l'étape

d'oxydation (Veech 1969). Généralement, les enzymes utilisant le cofacteur NAD(H) sont plus sujettes à oxyder *in vivo*, tandis que les enzymes préférant le NADP(H) auraient une activité réductase *in vivo* (Duester, 2000). Chez les vertébrés, la famille des ADHs comprend huit classes, ADH1 à 8 où les classes 1 à 7 sont NAD(H)-dépendantes, tandis que la classe 8 est NADP(H)-dépendante (Duester, 2001). Selon les espèces, les différentes classes comprennent plusieurs gènes, comme la classe ADH1 chez l'humain qui a trois isoformes ADH1A, ADH1B et ADH1C. ADH1 a été la première enzyme de cette famille reconnue pour oxyder le rétinol en rétinol (Duester, 2000). Longtemps il a été cru que cette étape d'oxydation était présente seulement dans les cellules où l'on retrouve de l'acide rétinoïque. Des études génétiques ont permis d'éclaircir l'implication des différentes ADHs dans la synthèse de l'AR. Des souris déficientes pour les gènes ADH1, ADH3 (Deltour et coll., 1999b) et ADH4 (Deltour et coll., 1999a) ont été générées afin de mieux comprendre leur implication dans le métabolisme de l'AR. L'expression d'ADH1 et 4 est spécifique à certains tissus, tandis qu'ADH3 est exprimée de manière ubiquitaire. L'ADH 4 est la plus efficace pour catalyser l'oxydation du rétinol en rétinol, de plus, son expression spatiotemporelle recoupe la distribution de l'acide rétinoïque dans l'embryon, suggérant son implication *in vivo* dans la production de rétinol (Deltour et coll., 1999b). L'ADH 1 peut aussi oxyder le rétinol mais moins efficacement qu'ADH 4. Cette dernière a une préférence pour les *cis* rétinol, tandis que l'ADH 1 préfère les *trans* rétinol (Deltour et coll., 1999b). Les souris déficientes en ADH 4 et ADH 1 sont normales et fertiles (Deltour et coll., 1999b). Les niveaux d'acide rétinoïque

produit chez les mutants étaient plus faibles comparativement au sauvage, cet effet était plus marqué pour ADH 4 qu'ADH 1 (Deltour et coll., 1999b). ADH3 a d'abord été associée à une oxydation du formaldéhyde, mais les études des souris déficientes en ce gène ont démontré sa contribution au métabolisme de l'AR (Molotkov et coll., 2002b). Son expression ubiquitaire concorde avec la présence de rétinol et la synthèse de l'AR dans plusieurs tissus. Le double mutant nul ADH1/ADH4 a été généré pour mieux définir le rôle de ces deux enzymes (Molotkov et coll., 2002a). Les études démontrent qu'ADH1 et ADH4 auraient des fonctions bien distinctes et qui ne se recoupent pas. ADH1 préviendrait la toxicité du rétinol en oxydant ce dernier (Molotkov, 2002a) qui, par la suite, est oxydé par RALDH1 (Molotkov et Duester, 2003) conduisant à son élimination. ADH4 interviendrait lors de déficience en vitamine A pour subvenir au développement embryonnaire (Molotkov et coll., 2002a). Ces trois ADHs oxydent le ROL mais chacune dans un but précis, ADH1 pour éviter l'accumulation de ROL, ADH3 pour la biosynthèse de l'AR, et ADH4 pour la survie de l'embryon.

1.5.2 Les déshydrogénases/réductases de courtes chaînes

Ces enzymes étaient d'abord appelées « insect-type alcohol dehydrogenase family » puis, par la suite, leur activité d'oxydoréductase et leur courte séquence leur ont valu d'être renommées déshydrogénases/réductases à courte chaîne (short-chain dehydrogenase/reductase family, SDR) (Opperman et coll., 2001). A

présent, il y a plus de 3000 SDRs provenant de plusieurs espèces et formes de vie (Opperman et coll., 2003). Les membres de cette grande famille sont identifiés par la présence de six motifs conservés dans leur séquence primaire (Opperman et coll., 2001). Il y a très peu d'identité entre les différentes SDRs dans leur séquence, soit environ 15 à 30%, cependant, au niveau de la structure tridimensionnelle, la similitude est très élevée comme le repliement de Rossmann, un feuillet β entouré d'hélices α , un élément important pour la liaison du cofacteur (Opperman et coll., 2001). Cette dernière caractéristique est typique et commune aux oxydoréductases (Opperman et coll., 2003). Les SDRs comprennent 250-350 résidus dont les extrémités N- et C-terminales constituent soit des domaines transmembranaires, soient ou des signaux peptidiques, ou encore sont impliquées dans la formation de complexes multi-enzymes. Ces enzymes sont réparties dans diverses catégories, allant des oxydoréductases et lyases aux isomérases (Filling, 2002). La grande majorité sont des oxydoréductases NAD(P)(H)-dépendantes capables d'oxyder les alcools comme le rétinol lors d'une réaction réversible. Les enzymes SDRs capables de catalyser le rétinol sont les rétinol déshydrogénases. Les enzymes microsomaux RDH1, RDH2, RDH3, RDH4, RDH5, RDH10, RDH11-14, CRAD1 (*cis*-retinol/3 α -hydroxysterol short-chain dehydrogenase), CRAD2, CRAD3 et retSDR1 oxydent le rétinol en rétinol, *in vitro*, mais préfèrent, dans certains cas, des stéroïdes (Duester, 2000). RDH5 et CRAD1 ont été localisées dans le réticulum endoplasmique (RE) attachées par deux hélices, en N-terminal et en C-terminal avec une queue cytosolique de six à sept nucléotides, et la partie catalytique de

l'enzyme retrouvée dans la lumière du RE (Lidén et coll., 2003). Cette queue cytosolique aurait un rôle dans l'activité enzymatique *in vivo* (Tryggvason et coll., 2001). RDH1 catalyserait le tout-*trans* ROL lié au CRBPI mais son efficacité plus grande pour l'oxydation des hydroxystéroïdes l'impliquerait plus dans le métabolisme des androgènes que dans la synthèse de l'AR (Duester, 2000). RDH2 serait impliquée dans la réduction NADPH-dépendante du rétinol et ce en présence du cytochrome P450 CYP2D1 (Imaoka et coll., 1998). Ces deux protéines étant exprimées surtout dans le foie, elles joueraient un rôle dans la réduction du rétinol en rétinol pour une éventuelle estérification de ce dernier, et donc son stockage (Ross et coll., 2000). Les trois enzymes CRADs auraient une fonction dans le métabolisme des stéroïdes plutôt que de l'AR même si elles sont capables d'oxyder le ROL *in vitro* (Duester et coll., 2003). retSDR1 exprimée dans la rétine, préfère le NADP/NADPH comme cofacteur et réduit le tout-*trans* RAL en tout-*trans* ROL. Ces données suggèrent une possible implication de cette enzyme dans la régénération du tout-*trans* ROL dans le cycle visuel (Haeseleer et coll., 1998). RDH5, RDH11 et RDH12 sont les enzymes connues pour oxyder *in vivo* le ROL dans le cycle visuel (Driessen et coll., 2000 ; Kim et coll., 2005). Elles ont une préférence pour les isomères *cis*. Les RDHs impliquées *in vivo* dans l'oxydation ou la réduction des rétinoïdes (ROL et RAL, respectivement), joueraient un rôle dans le cycle visuel plutôt que dans la synthèse de l'AR.

1.5.3 Les aldéhydes déshydrogénases

Les aldéhydes déshydrogénases (ALDH), dont le numéro, selon la nomenclature de la commission des enzymes est le 1.2.1.3, sont des oxydoréductases dépendantes du NAD ou du NADP. Elles font partie d'une grande famille de plus de 555 membres allant de la bactérie aux humains (Sophos et Vasiliou, 2003). Vu la grande variété d'ALDHs, un comité a été formé afin d'uniformiser la nomenclature de ces enzymes (Vasiliou et coll., 1999). La racine est ALDH, suivie d'un nombre arabe pour la famille, d'une lettre pour la sous-famille et finalement d'un nombre pour le membre de la sous-famille, par exemple ALDH1A1 (Vasiliou et coll., 1999). Les ALDHs eucaryotiques sont réparties en 18 familles et 37 sous-familles (Vasiliou et coll., 1999). Les membres d'une même famille partagent plus de 60% d'homologie et il y a moins de 40% d'homologie entre les différentes familles (Vasiliou et coll., 1999). Elles permettent l'oxydation d'aldéhyde en acide carboxylique correspondant. Les aldéhydes endogènes proviennent du métabolisme des acides aminés, des glucides, des lipides, des vitamines et des stéroïdes (Vasiliou et Nebert, 2005). La biotransformation de médicaments, de drogues et de polluants environnementaux est également une source d'aldéhydes (Vasiliou et Nebert, 2005). Les aldéhydes sont des molécules électrophiles hautement réactives avec les groupes amines et thiols. Les effets résultant de ces interactions sont de diverses natures comme la toxicité, la mutagénèse, la carcinogénèse mais peuvent aussi avoir des effets physiologiques et thérapeutiques (Vasiliou et Nebert, 2005). Les ALDHs sont

considérées comme des enzymes de détoxification des aldéhydes endogènes et exogènes. Elles peuvent aussi jouer un rôle important dans certains processus physiologiques comme la formation de l'AR et de l'acide γ -aminobutyrique (GABA) (Vasiliou et Nerbert, 2005). Ce sont des enzymes avec une structure semblable mais des activités et fonctions impliquées dans plusieurs voies métaboliques diverses (Perozich et coll., 1999a). La réaction enzymatique d'oxydation d'un aldéhyde en son acide correspondant est dépendante du NAD(P)⁺ et est irréversible (Yoshida et coll., 1998). Les gènes d'une longueur allant de 11 à 40 kpb sont composés de 10-13 exons et encodent pour une protéine de près de 500 acides aminés et d'environ 55 kDa. L'enzyme active est sous forme d'homodimère ou d'homotétramère. Avant 1999, où Vasiliou et coll. ont uniformisé la nomenclature des ALDHs, cette famille étendue se divisait en deux troncs principaux de l'arbre phylogénique. Le premier tronc, la classe 3, comportait la famille des aldéhydes à substrats spécifiques dont la classe ALDH3. Le second tronc, la classe 1/2, comprenait des enzymes à substrats variables incluant les classes ALDH1 et ALDH2. La classe 3 partage seulement 25% d'identité avec les classes 1 et 2, mais au niveau structurel de la protéine, elle est très proche de la classe 2 (Perozich et coll., 1999a). L'analyse de la séquence de 145 différents membres de la famille a permis d'identifier certaines régions qui sont conservées à travers les classes et les espèces (Perozich et coll., 1999b), suggérant qu'elles proviendraient d'un gène ancestral commun de plus de 3 milliards d'années (Vasiliou et coll. 1999). Quatre résidus invariants ont été identifiés soit Gly187/245 (numérotation selon classe 3/classe 1-2), Gly 240/299,

Glu333/399 et Phe335/401 (Perozich et coll., 1999b). Ces acides aminés seraient impliqués dans la liaison du cofacteur NAD (Gly 187/245, Glu333/399 et Phe 335/401) ou dans le positionnement du nucléophile Cys243/302 (Perozich et coll., 1999b). Douze résidus sont retrouvés dans 95% des séquences étudiées (Perozich et coll., 1999a). Ils seraient importants pour l'enzyme au niveau de sa structure et de son activité, comme la Cys 243/302 qui est présente chez toutes les enzymes ayant une activité catalytique (Perozich et coll., 1999a). De plus, dix motifs, c'est-à-dire des séquences d'acides aminés de longueur identique et d'un haut degré de similarité, ont été identifiés (Perozich et coll., 1999b). Tous ces motifs se retrouvent dans ou près du site actif de la molécule et contiennent les résidus mentionnés précédemment (Perozich et coll., 1999b). Les membres de la classe 3 sont des enzymes cytosoliques qui oxydent des aldéhydes aromatiques et aliphatiques à moyenne et longue chaîne (Vasiliou et coll., 2000). Dans la famille ALDH2, il n'y a qu'un membre, ALDH2, aucune sous-famille. C'est une enzyme mitochondriale fortement exprimée dans plusieurs tissus, particulièrement dans le foie (Yoshida et coll., 1998). Elle est impliquée dans le métabolisme de l'acétaldéhyde principalement pour sa détoxification. Elle est aussi responsable de la préférence et de la tolérance à l'alcool. D'ailleurs une mutation du gène, présente à plus de 50% chez les asiatiques et quelques amérindiens et moins de 10% chez les caucasiens, se caractérise par une grande sensibilité à l'alcool (Isse et coll., 2002).

1.5.3.1 Les ALDHs de classe 1

Les enzymes de classe 1 sont cytosoliques et distribuées dans plusieurs tissus aussi variés que le cerveau et les globules rouges. Elles peuvent être exprimées de manière constitutive ou encore induites. Elles catalysent l'oxydation d'aldéhydes aliphatiques. Certaines enzymes de la classe ALDH1 sont capables d'oxyder le rétinol en acide rétinoïque et peuvent ainsi jouer un rôle dans la production d'AR, ce sont les rétinaldéhydes déshydrogénases. Quatre enzymes sont connues pour l'oxydation du rétinol, trois enzymes font partie de la famille ALDH1 et sont nommées ALDH1A1 (RALDH1), ALDH1A2 (RALDH2), ALDH1A3 (RALDH3). RALDH4 (ALDH8A1) peut aussi oxyder le rétinol mais ne fait pas partie des ALDH1s. RALDH1 est exprimée durant le développement embryonnaire et chez l'adulte dans différents tissus selon l'espèce (Bhat, 1998), elle oxyde les isomères tout-*trans* et 9-*cis* du RAL (Bhat et Samaha, 1999 ; Brodeur et coll., 2003 ; Gagnon et coll., 2003 ; Labrecque et coll., 1995). RALDH2 est exprimée lors de la vie fœtale et catalyse l'oxydation des trois isomères, tout-*trans*, 9-*cis* et 13-*cis* (Gagnon et coll., 2002 ; Niederreither et coll., 1999). La RALDH3 est exprimée dans les voies olfactives en développement et dans l'œil et oxyde le tout-*trans* RAL (Grün et coll., 2000 ; Mic et coll., 2000, Li et coll., 2000 ; Lin et coll., 2003). La RALDH4 est fortement exprimée dans le foie et les reins adultes et catalyse l'oxydation du 9-*cis* RAL (Lin et Napoli, 2000 ; Lin et coll., 2003).

Le tableau I présente le schéma d'expression des différentes RALDHs et le tableau II (page 26), l'activité des enzymes pour les isomères du RAL.

Tissu	RALD1	RALDH2	RALDH3	RALDH4
Cerveau	pré-natale et post-natale		pré-natal	
Méninges	+	+	-	
Hypophyse antérieure	-	+	-	
Oeil	rétine, lentille	mésenchyme	rétine	
Nez	épithélia respiratoire et olfactif, (mésenchyme)	mésenchyme	épithélium olfactif, (mésenchyme)	
Dents	incisives	sac dentaire	+	
Cœur	(épicarde), valves	épicarde	-	
Oesophage/Estomac	épithélium et mésenchyme	mésenchyme	lamina propria	
Intestins	épithélium, mésenchyme externe	mésenchyme externe		
Poumons	bronches/parenchyme	mésothélium	(bronche/parenchyme)	
Foie	(+)			+
Reins	(cortex néphrogénique), tubes collecteurs	cortex néphrogénique	+	+
Glande surrénale	cortex interne	-	moëlle	
Prostate/Vésicule séminale	épithélium	mésenchyme	épithélium	
Muscles squelettiques	-	-	+	
Peau (follicule pileux)	(+)	-	+	

Tableau I : Expression des différentes RALDHs chez la souris (D'après: Niederreither et coll., 2002b) + : expression forte ou persistente ; (+) : expression faible ou temporaire et restreinte ; - : non détectable

ALDH	Espèces	Activité pour les substrats de RAL		
		Tout-trans	9-cis	13-cis
RALDH1	Humain	+	+	+
	Rat	+	+	-
	Singe	+	+	+
	Souris	+	+	-
RALDH2	Rat	+	+	+
	Souris	+	+	+
RALDH3	Humain	+	?	?
	Souris	+	?	?
RALDH4	Humain	Trace	+	?
	Souris	Trace	+	?
PB-ALDH1	Rat	-	Trace	-
	Souris	-	?	?

Tableau II : Activité des RALDHs pour les substrats de RAL.

1.5.3.1.1 La RALDH1

La RALDH1 a d'abord été isolée dans le foie comme aldéhyde déshydrogénase avec ALDH2 (Ikawa et coll., 1983). C'est en 1992 que Yoshida implique ALDH1 dans l'oxydation du RAL en AR. Bhat et coll. détectent, en 1988 (a), une activité d'oxydation du rétinol dans le rein de rat, mais c'est en 1993 (Labrecque et coll.) que l'enzyme est partiellement purifiée et caractérisée. Une ALDH, isolée de reins bovins, présente également une activité d'oxydation du RAL (Bhat et coll., 1996). Ensuite, la technologie a permis le clonage de l'enzyme chez plusieurs espèces, notamment l'humain (Hsu et coll., 1985 ; Yoshida et coll., 1985), la souris (Rongnopp et Weaver, 1991), le rat (Bhat et coll., 1995 ; Kathmann et Lipsky., 1997 ; Penzes et coll., 1997), le poulet (Godbout et Monckton, 2001) et le singe, dans la lignée cellulaire JTC12 (Brodeur et coll., 2003). Son expression tissulaire varie d'une espèce à l'autre. On la retrouve principalement dans le foie mais aussi dans le rein, les intestins, les poumons, l'estomac, la trachée, les testicules. D'ailleurs, une ALDH, semblable aux RALDH1s, peut être induite par l'administration de phénobarbital dans le foie de rat (Deitrich, 1971). Cette enzyme est la pALDH1 et a été clonée chez le rat (Dunn et coll., 1989) et la souris (Hsu et coll., 1999). RALDH1 semble jouer un rôle important dans la formation de l'acide rétinoïque, le métabolisme de l'éthanol et dans la détoxification des oxazaphosphorines comme le cyclophosphamide (Vasiliou et coll. 2000). Il a été observé que l'expression de la RALDH1 était

diminuée dans les tumeurs induites chimiquement chez les souris (Banfi et coll., 1994).

1.5.3.1.1.1 La structure du gène de la RALDH1

Le gène de la RALDH est d'une longueur d'environ 50 Kb, selon les espèces (Hsu et coll., 1985 ; Hsu et coll., 1999), et comprend 13 exons, typique des ALDH1s. Il est retrouvé sur le chromosome 9q21 chez l'humain (Raghunathan et coll., 1988). L'ADNc est composé de 1503 nucléotides et partage 90% d'homologie entre les espèces et avec les *pbALDH1* de rat et de souris (Dunn et coll., 1989 ; Hsu et coll., 1999). Le premier exon comprend le site d'initiation et le codon ATG. Le promoteur minimal des *RALDH1* humaines (Yanagawa et coll., 1995 ; Elizondo et coll., 2000), de souris (Hsu et coll., 1999 ; Rongneparut et Weaver, 1991) et de rat (Guimond et coll., 2002), ainsi que des *pbALDH1* de souris (Hsu et coll., 1999) et de rat (Dunn et coll., 1989) est très conservé avec une boîte CCAAT (~ -72 à -68) et une boîte TATA (~ -32 à -28). Un motif octamère (~ -55 à -49) est conservé dans tous les promoteurs, sauf celui du *pbALDH1* de rat où une délétion de 16 pb est présente. Des études de régulation (Yanagawa et coll., 1995 ; Guimond et coll., 2002 ; Elizondo et coll., 2000) ont permis d'identifier la boîte CCAAT et le motif octamère comme élément essentiel à l'activité basale du promoteur. Le facteur NF-YB lierait la boîte CCAAT et le facteur Oct-1 lierait le site octamère, chez l'humain et le rat (Yanagawa et coll., 1995 ; Guimond et coll., 2002). Chez l'humain, le facteur C/EBP β peut aussi

lier la boîte CCAAT et serait impliqué dans la rétroaction négative du gène *RALDH1* par l'AR. (Elizondo et coll., 2000). La délétion du site octamère chez la pbALDH1 de rat pourrait expliquer pourquoi cette enzyme n'est pas exprimée constitutivement dans le foie et les poumons, comparée à la pbALDH1 de souris (Kathmann et coll., 2000).

1.5.3.1.1.2 La structure de la protéine de la RALDH1

La protéine comprend 501 acides aminés et l'enzyme non dénaturée a une masse moléculaire de 140 kDa et se présente sous forme d'homotétramère dont la sous-unité fait 54 kDa. La similarité des séquences entre les RALDH1s est très élevée avec près de 95% (Penzes et coll., 1997). Les études structurales de la RALDH1 de mouton ont permis de déterminer les acides aminés impliqués dans la liaison du substrat et du cofacteur (Moore et coll., 1998). L'enzyme est divisée en trois domaines (Figure 1.5, page 44). Le domaine N-terminal de liaison du cofacteur NAD⁺ comprend les résidus 8 à 135 et 159 à 270 et est composé de cinq feuillets parallèles β . Le domaine catalytique, formé des résidus 271 à 470, contient six feuillets parallèles β . Le domaine d'oligomérisation, les résidus 140 à 158 et 486 à 495, est composé de trois feuillets anti-parallèles β .

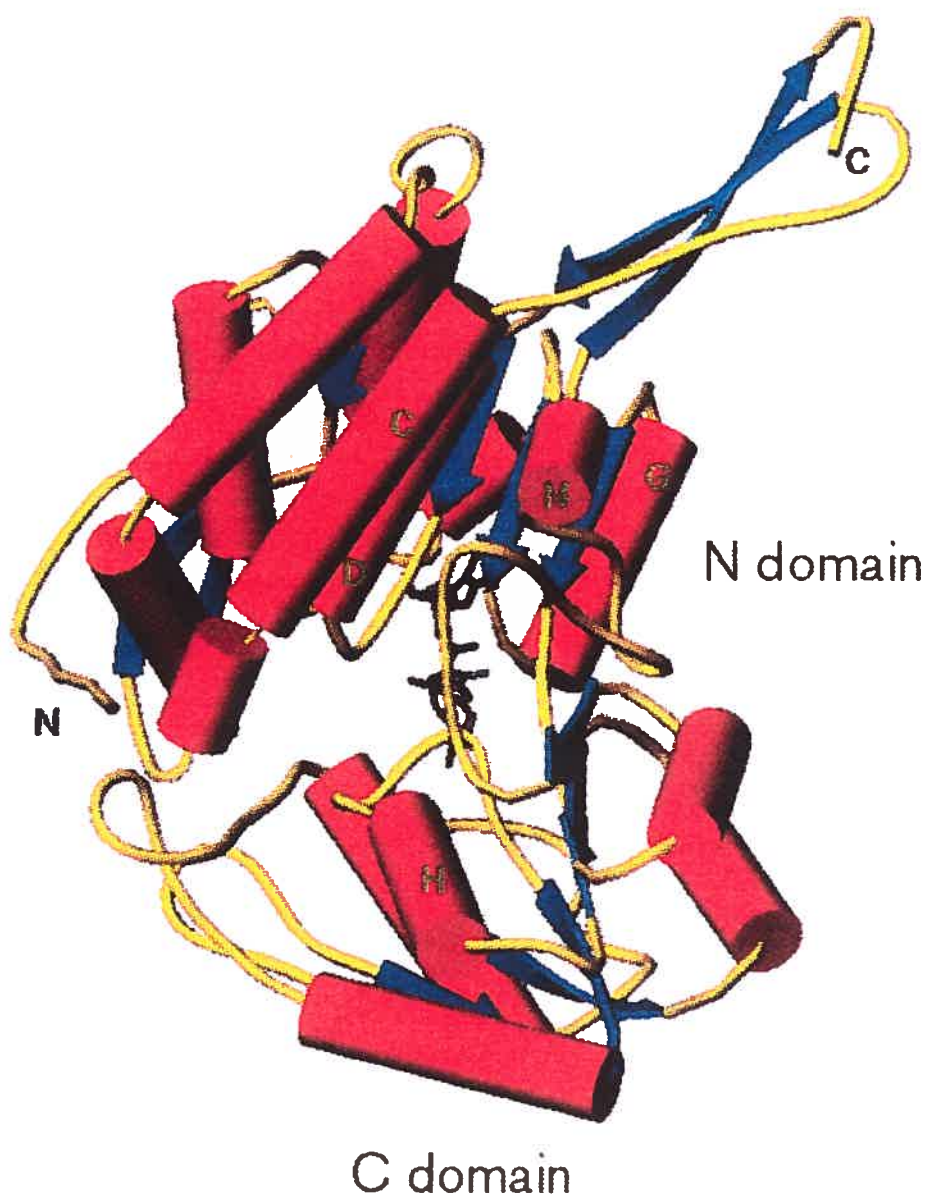


Figure 1.5 : Structure de la RALDH1 de mouton (Moore et coll., 1998)

Une grande différence existe entre les ALDH1s et ALDH2, le tunnel d'entrée du substrat (Figure 1.6) est plus grand chez ALDH1s (structure jaune) que chez ALDH2 (structure verte), suggérant leur préférence pour le RAL et l'acétaldéhyde respectivement (Moore et coll., 1998).

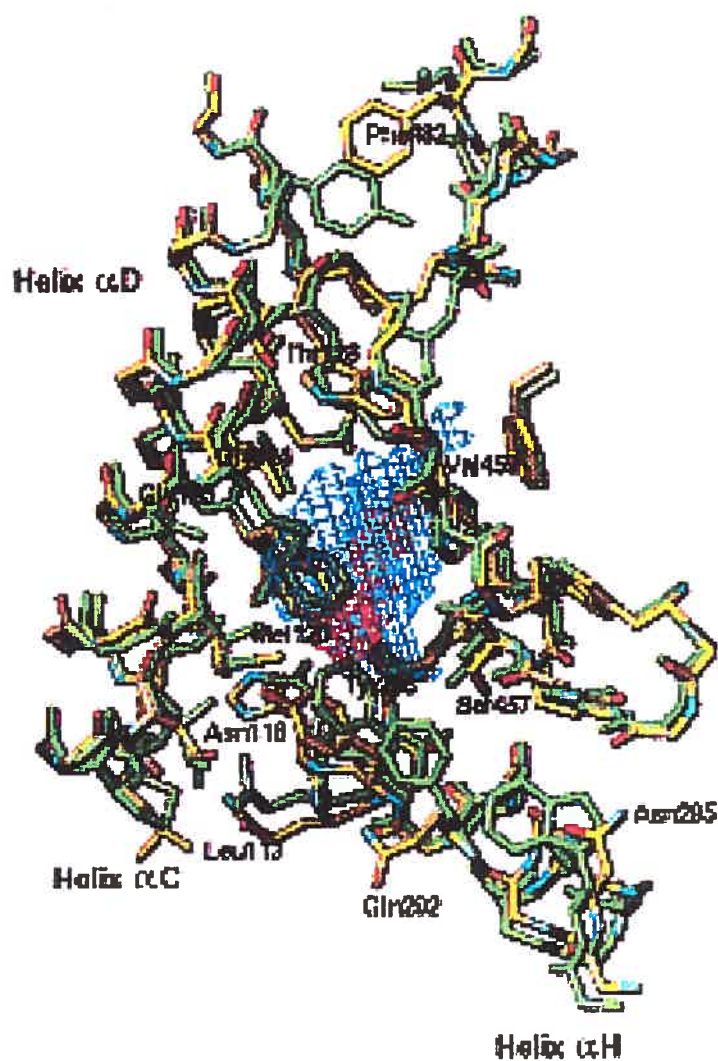


Figure 1.6 : Tunnel d'entrée du substrat (Moore et coll., 1998)

D'ailleurs, l'inhibition de l'activité enzymatique par le disulfiram des ALDH1s et non d'ALDH2 proviendrait du fait que le disulfiram est une grosse molécule qui logerait mieux dans le tunnel des ALDH1s, plus grand, que celui d'ALDH2 (Moore et coll., 1998). Le tunnel d'entrée du substrat est composé à la gauche de l'hélice α C (114-135), à l'arrière de l'hélice α D (170-185), en-dessous de l'hélice α H (282-296) et à la droite de la loupe de surface (455-461). De plus, la grandeur et la forme du tunnel seraient plus importantes pour la spécificité du substrat que ses propriétés physiques comme la polarité (Moore et coll., 1998). La cystéine en position 302 fait partie du site catalytique et est le nucléophile impliqué dans la formation d'un intermédiaire thiohémiacétal (Moore et coll., 1998). Des études avec des enzymes chimériques combinant la RALDH1 et la pbALDH1 de rat, ont permis de déterminer les régions impliquées dans l'oxydation des isoformes du RAL (Montplaisir et coll., 2002). Les aa 1 à 131 permettent l'oxydation du tout-*trans* RAL, tandis que les aa 132 à 343 catalysent le 9-*cis* RAL (Montplaisir et coll., 2002). De plus, les aa 132 à 500 seraient impliqués dans l'inhibition de l'activité enzymatique par le magnésium (chapitre 3).

1.5.3.1.1.3 L'expression de la RALDH1

L'enzyme RALDH1 a été clonée chez plusieurs espèces et l'expression tissulaire de l'enzyme varie selon l'espèce, l'âge et la présence de vitamine A. Elle est exprimée dans plusieurs tissus comme le foie, les reins, les poumons, les testicules, la rétine dorsale et les tissus épithéliaux de plusieurs organes comme

l'estomac, les intestins et la trachée. Chez la souris, la RALDH1 est présente dans le foie mais n'est pas exprimée dans le rein comparativement au rat où l'expression rénale est supérieure à son expression dans le foie. Chez le rat, elle est très peu exprimée lors de la vie fœtale, mais présente dans la vie adulte entre autre pour le maintien de l'intégrité épithéliale (Bhat, 1998 ; Bhat et coll., 1998a ; Bhat et coll., 1998b ; Frota-Ruchon et coll., 2000). Des études de souris déficientes pour le gène de la RALDH1 ont démontré que l'enzyme n'était pas nécessaire pour la production d'AR dans le développement de la rétine dorsale, mais serait impliquée dans l'élimination du ROL dans le foie (Fan et coll., 2003).

1.5.3.1.1.4 L'activité enzymatique de la RALDH1

L'oxydation du RAL en AR est une étape irréversible dépendante du NAD. La réaction enzymatique se fait en deux étapes, d'abord, il y a liaison du cofacteur NAD⁺ puis il y a liaison de l'aldéhyde, ce qui conduit à la formation d'un intermédiaire thiohémiacétal avec le site actif, le nucléophile Cys302. Par la suite, il y a formation d'un ion hybride en C4 de l'anneau de NAD⁺ dû au collapse avec le thioester. Le thioester est hydrolysé par une molécule d'eau puis il y a relâchement de l'acide et du NADH (Moore et coll., 1998). Les RALDH1s sont capables d'oxyder les isoformes tout-*trans* et 9-*cis* RAL (Bhat et Samaha, 1999 ; Brodeur et coll., 2003 ; Gagnon et coll., 2002 ; Labrecque et coll., 1995). Cependant, selon les espèces, certaines peuvent aussi oxyder le 13-*cis* RAL comme les RALDH1s humaines (Bhat et Samaha, 1999) et celles de la lignée

cellulaire JTC-12 (Brodeur et coll., 2003). Contrairement aux RALDH2 et 3, la RALDH1 catalyse plus efficacement l'isomère 9-*cis* que le tout-*trans*, suggérant qu'elle jouerait peut-être un rôle dans la production de l'AR 9-*cis* *in vivo*. La pbALDH1, quant à elle, n'a aucune activité pour le tout-*trans* RAL et catalyse très faiblement le 9-*cis* RAL (Hsu et coll., 1999 ; Kathmann et coll., 2000). De plus, il est intéressant de noter que deux régions différentes sont impliquées dans l'oxydation des isomères, soit les aa 1 à 131 pour le tout-*trans* RAL et les aa 132 à 343 pour le 9-*cis* RAL (Montplaisir et coll., 2002).

1.5.3.1.2 La RALDH2

Cette enzyme a été clonée par deux groupes et deux approches distinctes. Le groupe de Zhao et coll., (1996) a identifié la présence de trois enzymes dans la rétine de souris en développement, RALDH1, V1 et V2. Ces enzymes possédaient des schémas d'expression différents et le groupe s'est intéressé à la fraction V2. Le groupe de Wang et coll. (1996) a cloné RALDH2 lors du criblage d'une librairie d'expression de testicules de rat pour le clonage de RALDH1. La protéine comprend 499 acides aminés et partage 70% d'homologie de séquence avec RALDH1 et 3, et 90% entre les espèces. Le gène est composé de 13 exons, comme les autres RALDHS, et est localisé sur le chromosome 6 chez la souris (Hsu et coll., 2000). L'expression spatiotemporelle très spécifique de RALDH2 concorde avec la présence d'AR dans les tissus (Niederreither et coll., 1997). C'est la première RALDH exprimée dans l'embryon avec une expression à 7,5

jours. Des études génétiques ont démontré l'importance de RALDH2 dans la production d'AR lors du développement. En 1999, une souris déficiente dans ce gène a été rapportée par Niederreither et coll. Les embryons ne sont pas viables et ne dépassent pas le stade de 10,5 jours post-coïtum (Niederreither et coll., 1999). L'absence de RALDH2 affecte le développement de presque tous les organes sauf la rétine (Niederreither et coll., 1999). Le développement du cerveau postérieur est altéré au niveau de la segmentation, de la croissance et de l'organisation des rhombomères à cause de l'absence d'AR pour réguler l'expression de certains gènes homéobox et d'autres gènes comme *Krox20* (Niederreither et coll., 2000). Dans le cœur, le développement des tubes, le looping et la différenciation des cardiomyocytes sont affectés par le manque d'AR dû à la non-expression de RALDH2 (Niederreither et coll. 2001). Parmi les autres organes affectés, il y a l'oreille interne (Romand et coll., 2001), le pharynx (Niederreither et coll., 2003) les sommites et la formation de l'assymétrie du corps (Vermot et coll., 2005). Les embryons peuvent être rescapés par l'administration d'AR à la souris gestante, avec cependant certaines anomalies comme des troncs plus courts (Niederreither et coll., 1999, 2000, 2001, 2002c). L'AR administré prévient les malformations jusqu'au jour 8,5 environ, par la suite, si de l'AR est encore administré, des effets tératogènes semblables à de l'hypervitaminose A peuvent être observés (Mic et coll., 2002). Dans les régions crâniofaciales, RALDH1 et RALDH3 subviennent à la synthèse d'AR. Par contre, il semblerait qu'une autre enzyme soit impliquée dans la production d'AR dans certains tissus comme le cœur où il n'y a pas

d'expression de RALDH1, 2 ou 3, mais présence d'AR (Mic et coll., 2002 ; Niederreither et coll., 2001, Niederreither et coll., 2002c).

RALDH2 est active pour l'oxydation des isomères tout-*trans*, 9-*cis* et 13-*cis* RAL avec une préférence marquée pour le tout-*trans* (Gagnon et coll., 2002), contrairement aux autres RALDH1 (humain, souris, rat et JTC-12) qui catalysent plus efficacement l'isomère 9-*cis* (Bhat et Samaha, 1999 ; Brodeur et coll., 2003 ; Gagnon et coll., 2003 ; Labrecque et coll., 1995).

L'enzyme RALDH2 est donc nécessaire pour la synthèse *in vivo* d'AR à partir de rétinol. C'est le seul cas, parmi toutes les souris nulles produites, où la déficience d'un gène impliqué dans la biosynthèse de l'AR mène à une mortalité pré-natale.

1.5.3.1.3 La RALDH3

RALDH3 a d'abord été clonée dans la glande salivaire humaine (Hsu et coll., 1994) comme étant la sixième ALDH. Par la suite, la recherche d'une enzyme acide, fraction V1, capable d'oxyder le rétinol dans la rétine ventrale, mais différente de RALDH1 ou RALDH2 (McCaffery et coll., 1993), a conduit à l'amplification de RALDH3 à partir de tissus embryonnaires murins (Li et coll., 2000) et de poulet (Grün et coll., 2000), et de tissus de souris adultes, dans le rein (Mic et coll., 2000) et la rétine ventrale (Grün et coll., 2000). Cette enzyme, de 512 acides aminés, partage près de 90% d'homologie entre les espèces et près de

70% avec les RALDH1 et 2 (Mic et coll., 2000 ; Li et coll., 2000 ; Grün et coll., 2000). Elle est exprimée dans l'œil en développement à partir de 8,5 jours de vie embryonnaire chez la souris (Grün et coll., 2000 ; Mic et coll., 2000, Li et coll., 2000), et dans la vésicule otique et le système olfactif (Mic et coll., 2000). Chez l'humain, RALDH3 est fortement exprimée dans la glande salivaire, l'estomac et les reins, et à des niveaux plus faibles dans plusieurs autres tissus (Hsu et coll., 1994). Elle est aussi exprimée dans la glande mammaire normale et dans une lignée immortalisée de cellules épithéliales mammaires non-tumorigéniques (MTSV1.7), mais n'est pas exprimée dans la lignée MCF-7 (cellules épithéliales d'adénocarcinome de glande mammaire humaine) (Rexer et coll., 2001). Cette absence d'enzyme correspond à une incapacité à produire de l'AR dans les MCF-7 (Rexer et coll., 2001). D'ailleurs, lorsque RALDH3 est surexprimée dans les MCF-7, ces dernières acquièrent la capacité d'oxyder le RAL en AR (Rexer et coll., 2001). Récemment, une souris déficiente en RALDH3 a été générée et la mutation est létale dans les heures suivant la naissance (Dupé et coll., 2003). D'après le schéma d'expression de la RALDH3, il est surprenant de constater que les reins et les oreilles ne démontrent aucune affection particulière. Par contre, le développement de l'œil et des régions nasales est déficient. La rétine ventrale n'est que superficiellement affectée, probablement grâce à l'intervention de RALDH2 qui compenserait la production d'AR dans cet organe. La mortalité des nouveaux-nés est due aux malformations de la région nasale et plus particulièrement à l'atrésie choanale, soit la non-communication entre les cavités

nasales et orales, qui se traduit par une détresse respiratoire létale (Dupé et coll., 2003).

Depuis le clonage de RALDH3 dans les différentes espèces, peu de données étaient disponibles quant à son activité d'oxydation du rétinol. Toutes les études notaient la capacité à catalyser le tout-*trans* RAL, mais rien de très exhaustif jusqu'à dernièrement, où Graham et coll. (2006) ont caractérisé et cristallisé RALDH3. Leurs résultats confirment que le tout-*trans* RAL est le substrat de haute affinité de l'enzyme et qu'elle préfère les aldéhydes aliphatiques à huit carbones. Malheureusement, ils ne donnent aucune précision sur sa capacité à oxyder les isomères *cis* du RAL. Selon une note de Lin et Napoli (Lin et coll., 2003), RALDH3 ne catalyserait pas l'isomère 9-*cis* RAL, mais aucune donnée n'est publiée jusqu'à présent sur la cinétique de l'enzyme pour toutes les formes de RAL.

1.5.3.1.4 La RALDH4

RALDH4 a été clonée tout récemment chez l'humain (Lin et Napoli, 2000) et chez la souris (Lin et coll., 2003). Contrairement aux autres RALDHs, elle ne fait pas partie de la classe 1 des ALDHs mais plutôt de la classe 8 (Sophos et Vasiliou, 2003). Sa structure protéique contient les acides aminés hautement conservés caractérisant les ALDHs (Lin et Napoli, 2000 ; Lin et coll., 2003). Elle est fortement exprimée, chez l'adulte, dans le foie et le rein (Lin et Napoli, 2000 ;

Lin et coll., 2003), et elle est présente à 14,5 jours dans le foie d'embryon de souris, mais pas dans le rein (Lin et coll., 2003). RALDH4 possède une très grande activité enzymatique pour le 9-*cis* rétinol. Elle peut catalyser le 13-*cis* rétinol faiblement et le tout-*trans* rétinol très faiblement comparativement au 9-*cis* rétinol. Suite à des études de métabolisme avec CRAD1, il est suggéré que RALDH4 pourrait être impliquée dans la biosynthèse de l'AR 9-*cis* (Lin et Napoli, 2000). Sa présence dans les tissus, foie et rein, où est retrouvé le 9-*cis* rétinol (Labrecque et coll., 1995 ; Paik et coll., 2000) appuie cette hypothèse d'une implication de RALDH4 dans le métabolisme de l'AR 9-*cis*.

1.6 Le catabolisme de l'acide rétinoïque

L'AR en excès a des effets tératogènes, une régulation minutieuse de sa synthèse et de son élimination est donc essentielle. Certains membres de la grande famille des cytochromes P450 sont responsables de la dégradation de l'AR en métabolites polaires, ce sont les CYP26. À présent quatre sous-familles ont été identifiées et clonées, CYP26A1 (Abu-Abed et coll., 1998 ; Fujii et coll., 1997 ; Ray et coll., 1997 ; Wang et coll 2002 ; White et coll., 1997 ; White et coll., 1998), CYP26B1 (MacLean et coll., 2001 ; Nelson, 1999), CYP26C1 (Reijntjes et coll., 2004 ; Tahayato et coll., 2003 ; Taimi et coll., 2004) et CYP26D1 (Gu et coll., 2005). Ce sont des hydroxylases partageant moins de 30% d'homologie avec les autres membres de la grande famille du cytochrome P450, entre 40 et 50% avec les sous-familles de CYP26, et plus de 90% entre les espèces mammifères d'une

même sous-famille (Ray et coll., 1997 ; Taimi et coll., 2004). Elles catalysent l'oxydation de l'AR en métabolites inactifs, 4-hydroxy-AR, 18-hydroxy-AR et 5,8-époxy-AR, et en métabolite actif 4-oxo-AR (Reijntjes et coll., 2004). Ces enzymes sont régulées par l'AR, en excès d'AR il y a expression de CYP 26 et lorsque la concentration d'AR est raisonnable, l'enzyme n'est plus exprimée. De plus, lors d'une diète soutenue en vitamine A à des niveaux élevés mais non-toxiques, l'expression de CYP26A1 est également induite (Yamamoto et coll., 2000). Cependant, lors du développement embryonnaire, d'autres facteurs indépendants de l'AR peuvent réguler l'expression des CYP26s. Le patron d'expression des CYP26s est distinct pour chacune des enzymes et ne se superpose pas, suggérant un rôle spécifique à chacune (Reijntjes et coll., 2004). Elles sembleraient impliquées dans l'établissement d'un gradient d'AR, car leur expression délimite la frontière entre la présence ou non d'AR dans un tissu. Les souris déficientes pour le gène CYP26A1 (Sakai et coll., 2001 ; Abu-Abed et coll., 2001) meurent avant la naissance et présentent des signes de malformations similaires à ceux retrouvés lors d'un excès d'AR. Les souris peuvent être rescapées par un croisement avec des souris hétérozygotes *RALDH2*^{+/-}, chez lesquelles il y a une faible production d'AR (Niederreither et coll., 2002a, b, c).

Ces enzymes jouent un rôle important dans la régulation de gènes par l'AR, en gérant sa concentration dans les cellules cibles. Elles sont impliquées dans la gradation de la concentration d'AR nécessaire au développement.

1.7 Les récepteurs de l'acide rétinoïque

Pendant plusieurs années, il était connu que l'AR avait des effets physiologiques importants sur l'organisme mais les mécanismes restaient inconnus. La découverte du récepteur à l'AR, le RAR (Giguère et coll., 1987 ; Petkovich et coll., 1987), a permis d'éclaircir ces mécanismes d'action. L'AR est un élément actif dans la régulation de gènes grâce à sa liaison aux récepteurs nucléaires RAR et RXR (Figure 1.7).

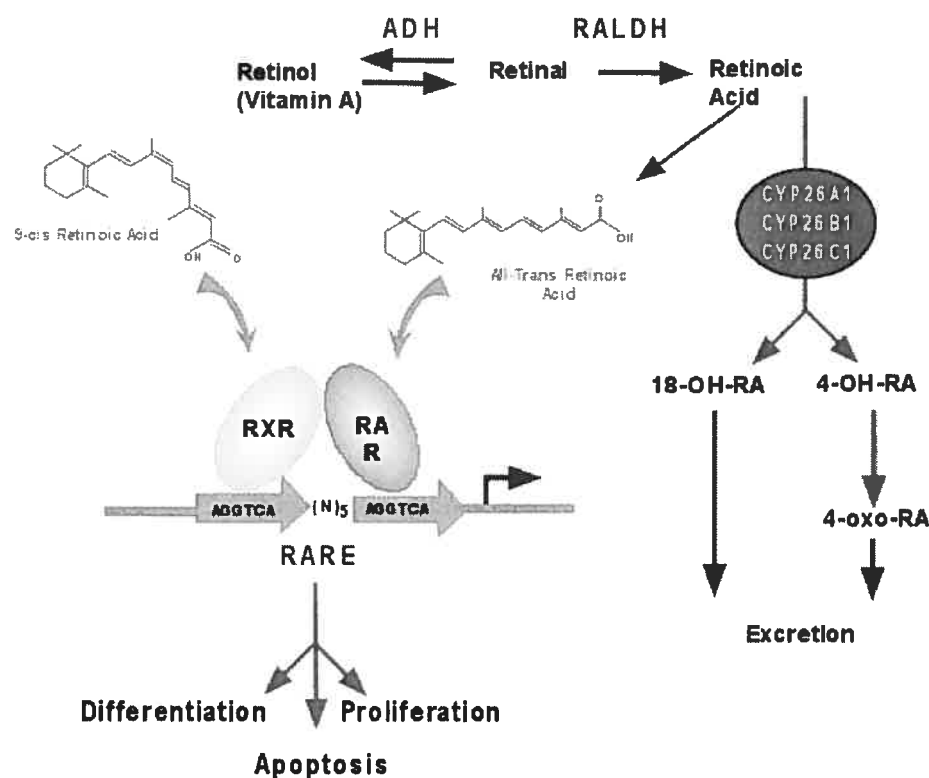


Figure 1.7 : Régulation de gènes par l'AR via les récepteurs RAR et RXR. (http://meds.queensu.ca/qcri/petkovich/ri_pmp.htm)

Les RARs et RXRs sont membres de la superfamille des récepteurs nucléaires hormonaux. Il existe deux sous-familles de récepteurs hormonaux, soit le type I qui comprend les récepteurs nucléaires des glucocorticoïdes, de la progestérone et des oestrogènes, et le type II qui regroupe les récepteurs RAR, RXR, ceux des hormones thyroïdiennes (TR), de la vitamine D3 (VDR) et des proliférateurs des peroxyosomes (PPAR). Les deux sous-familles se distinguent par certaines caractéristiques comme les liaisons avec le ligand et l'élément de réponse. Les récepteurs de type I doivent d'abord se fixer sur leur ligand pour pouvoir se lier à leur élément de réponse, un palindrome inversé séparé de trois nucléotides. Les récepteurs de type II peuvent, en l'absence de leur ligand, lier leur élément de réponse qui est une répétition directe de six nucléotides. Les récepteurs de cette famille sont composés de 4 régions indépendantes mais interactives (Figure 1.8A page 57). Le domaine A/B ou modulateur, le domaine de liaison à l'ADN (DNA Binding Domain, DBD), la région charnière et le domaine de liaison du ligand (Ligand Binding Domain, LBD). Le domaine A/B est très variable, autant au niveau de sa longueur que de sa séquence primaire. Cette variété permet de générer plusieurs récepteurs nucléaires isoformes ayant les mêmes sites de liaison à l'ADN et au ligand, mais avec des propriétés physiologiques distinctes. Ces isoformes sont obtenues suite à de l'épissage alternatif, à des promoteurs différents ou bien à des sites d'initiation distincts (Giguère, 1994). Le domaine de liaison à l'ADN est le plus conservé. Il est composé de deux doigts de zinc de 66 à 70 acides aminés. Les récepteurs vont se lier aux éléments de réponse présent dans la séquence promotrice des gènes répondant à l'AR, via une hélice α présente

dans le DBD. Les éléments de réponse à l'AR (RARE) et aux rétinoïdes X (RXRE) sont une répétition directe 5' AGGTCA 3', espacée par 1 à 5 nucléotides (DR1 à DR5) (Figure 1.8B). Le domaine de liaison du ligand contient une poche pour le ligand, mais également des régions d'interactions protéine-protéine permettant la formation de dimères (Kersten et coll., 1997).

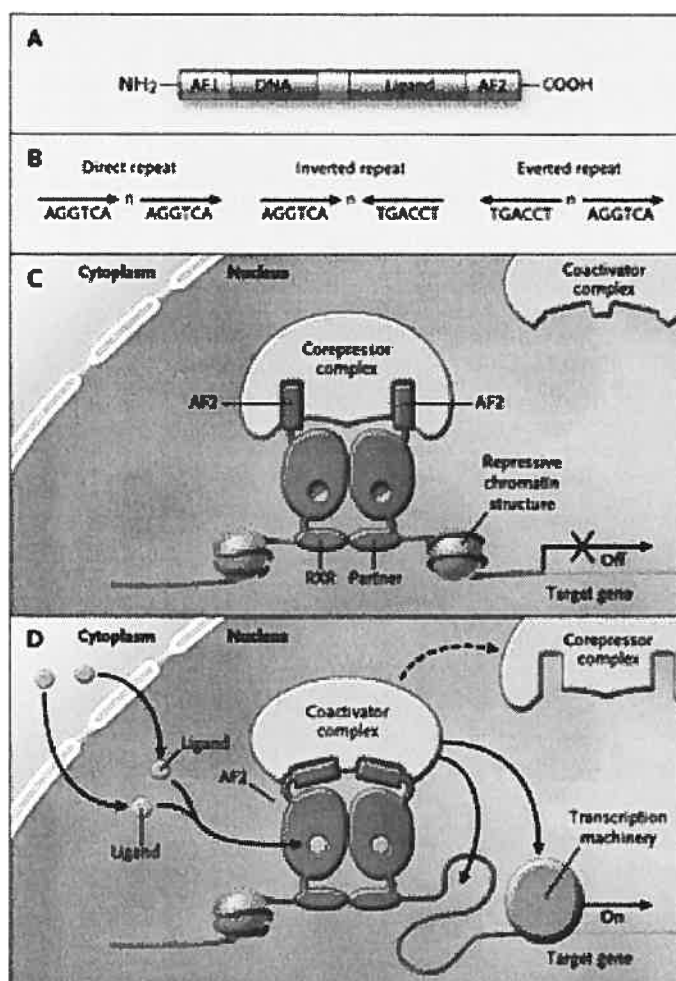


Figure 1.8 : Récepteur à l'AR (RAR et RXR) et mécanisme d'action (Shulman et Mangelsdorf, 2005)

1.7.1 Les RARs

Il existe plusieurs isotypes de RAR comprenant différentes isoformes, $RAR\alpha1$, $\alpha2$, $RAR\beta1$, $\beta2$, $\beta3$, $\beta4$, et $RAR\gamma1$, $\gamma2$ (Chambon 1996). Les RARs peuvent lier les isomères tout-*trans* et 9-*cis* de l'AR. Les gènes des $RAR\alpha$, β et γ sont localisés sur les chromosomes 11, 14 et 15 et 17q21.1, 3p24 et 12q13 chez la souris et l'humain respectivement et seraient vraisemblablement le résultat d'une duplication d'un gène ancestral commun (Giguère, 1994). Les isoformes $RAR\alpha1$ et $\alpha2$ sont le résultat de l'utilisation de promoteurs distincts dans le gène de $RAR\alpha$. Dans le cas de $RAR\beta$, c'est une combinaison de promoteur distinct et d'épissage alternatif qui génère les différentes isoformes. L'expression tissulaire des RARs est très variée. $RAR\alpha$ est exprimé de manière ubiquitaire mais plus fortement dans des régions spécifiques du cerveau (; de Thé et coll., 1989 ; Giguère et coll., 1987 ; Noji et coll. 1989a). Malgré une expression très similaire entre $RAR\alpha1$ et $RAR\alpha2$, il y a des différences. $RAR\alpha1$ est plus abondant dans le cerveau, la peau, les muscles, le cœur et les reins, tandis que $RAR\alpha2$ est plus exprimé dans les poumons, le foie et les intestins (Giguère, 1994). Le gène de $RAR\beta$ produit plusieurs transcrits et est exprimé dans plusieurs tissus. $RAR\beta1$ et $\beta3$ sont générés à partir du même promoteur et sont retrouvés principalement dans le cerveau, la peau et les poumons (Zelent et coll., 1991), tandis que les $RAR\beta2$ et $\beta4$, aussi générés à partir du même promoteur, se retrouvent dans les reins, le foie, les poumons, le cœur, les muscles, les intestins et le cerveau, mais à des niveaux d'expression variables (Benbrook et coll., 1988 ; de Thé et coll., 1989). Les

RAR γ 1 et γ 2 sont présents dans la peau et les poumons (Zelent et coll. 1989 ; Kastner et coll. 1990 ; Noji et coll., 1989b). Des études génétiques ont impliqué ces récepteurs dans la régulation de gènes par l'AR tout-*trans*. Les souris ayant une simple mutation nulle pour les gènes RAR α , β et γ sont viables, mais présentent des anomalies retrouvées lors d'une carence en vitamine A post-natale (Mark et coll., 1999). Une redondance fonctionnelle existe entre ces récepteurs car les doubles mutants nuls meurent *in utero* ou à la naissance avec toutes les malformations associées à un manque de vitamine A (Mark et coll., 1999). Ce sont des récepteurs essentiels au développement qui permettent la régulation de gènes par l'AR.

1.7.2 Les RXRs

L'ADNc de RXR α a été cloné à cause de son homologie avec le domaine de liaison à l'ADN de RAR α (Mangelsdorf et coll., 1990). Malgré tout, les RARs ressemblent plus aux TR qu'aux RXR qui font partie d'un sous-groupe de récepteurs nucléaires orphelins (Giguère, 1994). Tout comme les RARs, les RXRs peuvent lier l'AR tout-*trans* mais à des concentrations très élevées d'où la recherche d'un autre ligand similaire à l'AR tout-*trans*. Deux équipes ont identifié l'AR 9-*cis* comme ligand de haute affinité pour RXR,. (Heyman et coll., 1992 ; Levin et coll., 1992). Trois isotypes, α , β et γ , ont été identifiés jusqu'à présent, avec chacun deux isoformes α 1 et α 2, β 1 et β 2, et γ 1 et γ 2 (Mark et coll., 2006). Ils sont retrouvés sur les chromosomes murins 2, 17 et 1 respectivement

pour RXR α , β , γ (Giguère, 1994). La distribution cellulaire des RXRs varie selon l'isotype. RXR α est retrouvé dans le foie, les reins et la peau, RXR γ , dans le cœur et les muscles (Rowe, 1997). Leur expression est restreinte comparativement à RXR β , exprimé de manière ubiquitaire (Rowe, 1997). Cependant, des études avec des souris déficientes en ces différents RXRs ont démontré que RXR α est de loin le plus important (Krezel et coll., 1996). Les mutants RXR α -/- meurent avant la naissance et présentent des malformations du myocarde et de l'œil semblables à celles observées chez des souris souffrant du syndrome d'hypovitaminose A fœtale (Kastner et coll., 1994).

Les RXRs ont la capacité de former des homodimères et des hétérodimères avec les RARs et d'autres récepteurs comme PPAR, VDR, TR et RARs. L'association de RXR avec d'autres récepteurs peut être de deux types, une hétérodimérisation non-permissive ou permissive. Dans le premier cas, le complexe n'est activé que par la présence du ligand du partenaire. Parmi les récepteurs non-permissifs, il y a RAR, TR et VDR (Giguère, 1999). Dans les complexes RXR/VDR ou TR, RXR est un partenaire silencieux, tandis que dans le complexe RXR/RAR, le ligand de RXR peut se fixer mais le complexe est actif seulement en présence du ligand de RAR (Giguère, 1999). Dans le cas d'une liaison permissive, l'hétérodimère peut être activé par les deux ligands indépendamment. Parmi les récepteurs permissifs, il y a les PPARs, LXR et COUP. En absence de ligand, le récepteur RXR forme des homotétramères. À la liaison de l'AR 9-*cis*, le tétramère se dissocie et il y a changement de conformation du récepteur suggérant

un mécanisme de régulation de la formation d'hétérodimères avec RXR (Kersten et coll., 1995a, b, c, 1998). Les RXRs sont importants dans l'organisme, leur hétérodimérisation les implique dans plusieurs voies métaboliques comme celle des lipides (Shulman et Mangelsdorf, 2005).

1.7.3 Les éléments de réponse des récepteurs à l'AR

Les éléments de réponse des récepteurs nucléaires hormonaux de type II se ressemblent beaucoup (Figure 1.8B, page 43). Il s'agit de deux répétitions directes de la séquence 5'-AGGTCA-3', espacées par un à cinq nucléotides (DR1 à DR5). La région très conservée du domaine de liaison à l'ADN des récepteurs hormonaux, ainsi que la simplicité de l'élément de réponse laissent supposer que tous les récepteurs peuvent lier tous les éléments de réponse et réguler les mêmes gènes. Malgré tout, la régulation de gènes est très spécifique à des couples de récepteurs donnés. Selon la règle 1-5 (Umesono et coll., 1991), l'espacement entre les répétitions directes peut, à elle seule, déterminer la spécificité de liaison de l'hétérodimère. La longueur de l'espacement est plus importante pour déterminer la spécificité d'une liaison que sa séquence de nucléotides (Rastinejad et coll., 2000). D'ailleurs, en modifiant l'espacement entre les deux demi-sites, il est possible de changer le dimère qui va lier l'élément de réponse (Rastinejad, 2001). Les DR1 lient les hétérodimères de RXR avec RAR, PPAR, COUP et HNF-4, les DR2 ceux de RXR avec PPAR et RAR, les DR3, RXR-VDR, les DR4, les hétérodimères RXR-TR, LXR et CAR, et les DR5 lient les

hétérodimères RXR-RAR et RXR-NGFI-B (Rastinejad, 2001). La présence de RXR dans tous ces dimères ne signifie pas que tous les gènes seront régulés par l'AR. Cette régulation dépend du type de dimérisation, si elle est permissive ou non. La liaison permissive permet au ligand de RXR de réguler la transcription, tandis que les hétérodimères non-permissifs ne sont actifs qu'en présence du ligand du partenaire de RXR (Giguère, 1999). En majorité, le récepteur RXR se retrouve sur le demi-site en 5', et le partenaire sur le demi-site en 3'. Sur un élément DR1, la polarité est inversée, avec RXR en 3' et le partenaire en 5' (Rastinejad et coll., 2000). La polarité du récepteur RXR en 5' ou 3' peut avoir un effet d'activation ou de répression de la transcription, comme chez les hétérodimères RXR-RAR (DR5) et RAR-RXR (DR1), respectivement (Rastinejad, 2001). Malgré leur simplicité, les éléments de réponse permettent une régulation très spécifique de la transcription de gènes.

1.8 Les effets physiologiques et pathologiques

Les effets physiologiques de la vitamine A, à part la vision, proviennent de la liaison de l'AR aux récepteurs nucléaires RAR et RXR. L'administration d'AR peut prévenir ou bien renverser les effets d'une déficience en vitamine A (Thompson et coll., 1964). De plus, un excès d'AR est plus néfaste qu'un excès de rétinol dans l'organisme et peut causer des malformations (Lohnes et coll., 1994). Plus de 532 gènes sont connus pour être sous le contrôle de l'AR de manière directe ou indirecte (Balmer et Blomhoff, 2002). La régulation directe

d'un gène est possible lorsqu'un élément de réponse est présent dans le promoteur du gène régulé et que RAR et RXR sont impliqués dans l'activation ou bien l'inhibition du gène (Balmer et Blomhoff, 2002). Parmi les gènes régulés par la voie classique, il y a deux grandes catégories soit les gènes impliqués dans le métabolisme et le fonctionnement des rétinoïdes, et les gènes contenant des domaines homéobox (Balmer et Blomhoff, 2002). Lors d'une régulation indirecte, un gène est activé par un autre gène lui-même activé par l'AR. La régulation indirecte peut également s'effectuer au niveau de la stabilité de l'ARNm. Cependant, pour la plupart des gènes, la régulation directe ou indirecte n'est pas confirmée (Balmer et Blomhoff, 2002). Plusieurs voies métaboliques et pathologies sont affectées par la vitamine A et ses dérivés. L'AR est un agent bénéfique dans beaucoup de cas mais en excès, les effets secondaires peuvent avoir des conséquences néfastes.

Les effets physiologiques de la vitamine A et ses dérivés sont tous reliés entre eux. Par exemple, une carence en vitamine A affecte l'intégrité épithéliale qui joue un rôle dans l'immunité et peut entraîner des cancers sans oublier toutes les voies métaboliques affectées. Lorsque le métabolisme de la vitamine A devient dysfonctionnel dans un système, il est fortement probable que plusieurs autres systèmes seront touchés, pouvant causer ainsi des maladies.

1.8.1 La vision

Les troubles de vision nocturne sont connus depuis très longtemps, mais la relation avec une carence nutritionnelle n'a été établie qu'en 1917, lors d'une étude expérimentale de malnutrition infantile (Bloch, 1919). Plus tard, des études ont permis de relier la vitamine A, le RAL et les caroténoïdes au cycle visuel. Dans le cycle visuel, le 11-*cis* RAL est couplé à l'opsine pour former la rhodopsine, un pigment violet. Lorsqu'illuminé, le 11-*cis* RAL est isomérisé en tout-*trans* RAL, le complexe tout-*trans* RAL-opsine forme un pigment jaune. Le tout-*trans* RAL, libéré de l'opsine, est réduit en tout-*trans* ROL qui est estérifié en RE tout-*trans*, puis simultanément isomérisé et hydrolysé pour former le 11-*cis* ROL. Ce dernier est, par la suite, oxydé pour former à nouveau du 11-*cis* RAL et repartir le cycle (Wolf, 2001). Dans le cycle visuel l'AR n'est pas en cause. La vision, très affectée par l'hypovitaminose A, sert à sa détection. La structure de l'œil peut également être lésée par une carence en vitamine A. Dans ce cas, ce sont les cellules épithéliales, la conjonctive et la cornée qui s'assèchent et se kératinisent par manque d'AR (McLaren et Friggs, 2002). La vision est un bon indicateur du statut de la vitamine A dans l'organisme. Dans la majorité des cas, les moins sévères, il est possible de renverser les effets d'une déficience.

1.8.2 Le cancer

Les bienfaits de l'AR dans le traitement de différentes formes de cancer ne font que croître. Il permet aux cellules de se redifférencier et agit comme antiproliférateur en inhibant la mitose et en induisant l'apoptose. Souvent, en combinaison avec d'autres agents, l'AR est un excellent élément dans la chimoprévention et dans le traitement de plusieurs types de cancer.

Le développement d'un cancer est souvent associé à des anomalies des récepteurs à l'AR. Cependant, il semblerait que des altérations de la synthèse des rétinoïdes seraient impliquées dans la carcinogénèse. Dans le cancer de la prostate, le promoteur de la RALDH2 est hyperméthylé et rend le gène silencieux (Kim et coll., 2005), empêchant la production d'AR. De même, dans les cellules mammaires MCF-7, la RALDH3 n'est pas exprimée (Rexer et coll., 2001) et les cellules ne sont plus capables de synthétiser l'AR à partir de ROL (Mira-y-Lopez et coll., 2000). Les enzymes de la synthèse de l'AR auraient des propriétés de suppresseur de tumeur et l'absence d'AR jouerait un rôle important dans le dérèglement des cellules cancéreuses.

1.8.2.1 La leucémie aigüe promyélocytaire

La leucémie aigüe promyélocytaire est caractérisée par une translocation chromosomale t(15 ;17) (Larson et coll., 1984) entraînant la fusion du gène PML

sur le chromosome humain 15 avec le gène *RARA* sur le chromosome 17 (de Thé et coll., 1991 ; Kakizuka et coll., 1991). Les protéines de fusion obtenues, PML/RAR α et RAR α /PML, sont de longueurs variables qui dépendent du point de rupture dans le gène PML. La rupture dans le gène *RARA* est toujours dans le second intron (Chomienne et coll., 1996). Chez les personnes atteintes, la croissance des cellules promyélocyaires est bloquée au stade de la différenciation. Il en résulte une accumulation de granulocytes dans la moëlle osseuse et le sang et pouvant causer des hémorragies mortelles (Lengfelder et coll., 2005). Le récepteur aberrant PML/RAR α , comme le RAR α sauvage, a la propriété d'inhiber la transcription de gène (Melnick et Licht, 1999). Cependant, la liaison du ligand, l'AR, sur le récepteur sauvage permet l'activation de la transcription, cette capacité étant altérée dans le récepteur mutant (Melnick et Licht, 1999). Il semblerait que la liaison du récepteur PML/RAR α avec les co-répresseurs SMRT et N-CoR serait plus forte et nécessiterait des doses plus élevées d'AR pour permettre la dissociation du complexe (Melnick et Licht, 1999). Un autre mécanisme d'inhibition de la transcription est la séquestration du récepteur RXR par le récepteur mutant, empêchant ainsi sa liaison avec d'autres récepteurs nucléaires comme VDR et PPAR (Melnick et Licht, 1999).

Le traitement de la leucémie aigüe promyélocytaire par l'AR fut une grande avancée permettant même une rémission complète de la maladie. Tel que nous l'avons vu précédemment, l'AR, en concentration pharmacologique, permet la dissociation des co-répresseurs avec le récepteur PML/RAR α et ainsi l'induction

de la différenciation des cellules promyélocytaïres. Les patients peuvent néanmoins développer des effets secondaires comme le syndrome d'AR ou encore une résistance à l'AR (Lengfelder et coll., 2005). D'ailleurs, le traitement à l'AR est souvent combiné à un autre type de traitement comme la chimiothérapie (Lengfelder et coll., 2005).

1.8.3 Le système immunitaire

Il est connu qu'une malnutrition a un effet direct sur les infections qui augmentent le risque de malnutrition. Dans les pays où l'alimentation est pauvre en vitamine A, il a été démontré que les enfants d'âge pré-scolaire présentant un signe d'hypovitaminose A, la xérophtalmie, avaient une infection ou bien un histoire d'infection récente (Stephensen, 2001). Les infections les plus communes étant la diarrhée, la pneumonie et la rougeole. Dans les cas extrêmes, elles peuvent causer la mort.

Les immunités, innée et acquise, sont perturbées par l'hypovitaminose A. Les muqueuses des voies respiratoires, intestinales et uro-génitales, barrières naturelles de l'organisme, présentent une diminution de la production de mucus et par le fait même, une moins grande résistance aux infections par des pathogènes habituellement éliminés dans le mucus (Stephensen, 2001). La fonction des neutrophiles est altérée même si leur nombre est plus élevé, les macrophages perdent leur capacité à phagocyter les bactéries et la protection antivirale est

fortement réduite chez les cellules tueuses naturelles (Stephensen, 2001). Les effets de la vitamine A sur l'immunité acquise est très variable. Elle peut, selon l'âge et l'état de santé, augmenter ou diminuer la production d'anticorps et de cytokines par les cellules B et T respectivement, et affecter la production et la maturation des lymphocytes (Villamor et Fawzi, 2005).

1.8.4 Le développement

Il est connu depuis les années 1930 que la vitamine A a un effet sur le développement embryonnaire. Une insuffisance maternelle en vitamine A conduit à la mort de l'embryon qui présente des malformations congénitales (Ross et coll., 2000). Une étude de Wellik et DeLuca (1995) a démontré que l'administration d'AR seul à la rate gestante ne peut rescaper l'embryon contrairement au ROL. Depuis la découverte des récepteurs RAR et RXR, les effets de la vitamine A sur le développement ont été associés à son dérivé, l'AR. D'ailleurs les bienfaits du ROL sur le sauvetage des embryons seraient fort possiblement dus à son oxydation en AR dans les cellules du fœtus.

L'excès d'AR a aussi des effets tératogènes sur l'embryon. L'administration locale d'AR sur des régions précises du cœur d'embryons de cailles a mené à la duplication du cœur (*cardia bifida*), au *situs inversus*, et à des anomalies de looping (Dickman et Smith, 1996; Osmond et coll., 1991).

Le chevauchement des effets observés lors de déficience et d'excès démontre l'importance de la vitamine A dans le développement. Les études sur les souris nulles pour les gènes impliqués dans le métabolisme du ROL ont permis de préciser le rôle de l'AR dans le développement embryonnaire. Les principaux organes ciblés par l'AR sont le cœur, l'œil, le système nerveux central, et les systèmes circulatoire, urogénital et respiratoire (Zile, 1998).

1.8.5 L'intégrité épithéliale

L'épithélium est un tissu retrouvé dans différents endroits de l'organisme, il couvre les surfaces internes et externes du corps, par exemple la muqueuse intestinale et la peau. L'épithélium sert de barrière contre les éléments extérieurs comme les polluants de l'air et les contaminants alimentaires. L'épithélium comprend quatre phénotypes selon sa localisation et ses fonctions. La complexité des phénotypes est influencée par la concentration d'AR. Dans la peau, plusieurs couches de cellules sont superposées. Les cellules à la base de l'épiderme sont des cellules prismatiques simples qui se différencient en kératinocytes à la surface de l'épiderme à mesure que la concentration d'AR diminue. Le processus de kératinisation est réversible en présence d'AR. Dans les cas extrêmes de déficience, les cellules perdent leurs propriétés protectrices et conduisent à des cancers de l'épithélium, des kératoses, ou encore la liquéfaction de la cornée de l'œil. D'ailleurs plusieurs cancers d'organes comme les intestins, les poumons et l'estomac vont débiter par des cancers de l'épithélium de ces différents organes.

L'AR et le ROL sont couramment utilisés comme traitement pour plusieurs maladies de peau comme l'acné, le psoriasis et le vieillissement de la peau. L'AR joue un rôle important dans la différenciation des kératinocytes et la conservation de l'intégrité épithéliale. Plusieurs crèmes thérapeutiques utilisées contiennent du ROL, de l'AR tout-*trans* ou 13-*cis*, mais certaines contiennent des agents qui affectent le métabolisme de l'AR afin d'augmenter la concentration de ce dernier dans l'épiderme et retarder son catabolisme. Il existe de plus en plus de composés synthétiques semblables à l'AR. Ils ont les propriétés positives de l'AR sans ses effets secondaires.

1.8.6 Les autres implications

Les implications des rétinoïdes sont tellement variées et étendues que plusieurs aspects n'ont été que récemment étudiés. Les rétinoïdes sont impliqués dans plusieurs systèmes de l'organisme généralement via leurs récepteurs nucléaires. Ils régulent notamment l'expression des gènes impliqués dans le métabolisme des triglycérides. Une augmentation de ce métabolisme peut augmenter l'incidence de maladies cardiovasculaires (Staels, 2001).

Ils sont essentiels pour le développement du système nerveux central; mais également pour les fonctions du cerveau adulte. Ils seraient impliqués dans la mémoire et l'apprentissage et dans la maladie d'alzheimer (Lane et Bailey, 2005).

De plus, dans le cerveau, plusieurs gènes régulés par l'AR et les hormones thyroïdiennes font partie de processus pathologiques retrouvés dans la schizophrénie (Palha et Goodman, 2005).

Une autre pathologie associée à la vitamine A est le syndrome d'alcoolisme fœtale. Les phénotypes observés comme les malformations crânio-faciales correspondent aux organes ciblés par la vitamine A et ses dérivés. La synthèse d'AR est inhibée par la présence d'éthanol qui compétitionne avec le ROL pour l'oxydation par les rétinol déshydrogénases.

L'implication de RXR et ses partenaires d'hétérodimérisation dans le syndrome métabolique, caractérisé par de l'obésité, de l'hypertension, du diabète et des maladies cardiovasculaires (Shulman et Mangelsdorf, 2005), met en évidence l'importance de l'AR dans l'organisme.

1.9 Les hypothèses

La RALDH1 est une enzyme importante dans la production d'AR pendant la vie adulte. Elle est capable d'oxyder spécifiquement différents isomères du rétinol (tout-*trans*, 9-*cis* et 13-*cis*) en fonction de l'espèce. Il existe très peu de données sur l'implication des différentes RALDHs dans les pathophysiologies reliées à l'AR, mais diverses études tendent à démontrer leur rôle.

Les isomères 9-*cis* et 13-*cis* de l'AR semblent jouer un rôle primordial dans plusieurs voies métaboliques en liant les récepteurs RAR et RXR ou bien de manière indépendante aux récepteurs. Nous supposons que ces deux isoformes sont synthétisées suite à l'oxydation, par les RALDHs, du RAL de même conformation sans isomérisation comme c'est le cas pour l'AR tout-*trans*.

1.10 Les objectifs

Le principal objectif de cette thèse est d'étudier la biosynthèse des différentes isoformes de l'acide rétinoïque par des RALDHs, sauvages ou chimériques. Nous voulons développer des outils afin d'étudier le métabolisme de l'AR *in vitro*, dans des lignées cellulaires et *in vivo*, de mieux comprendre les interactions de l'enzyme avec le substrat, et de déterminer l'implication des différentes isoformes de l'AR dans les divers processus physiologiques.

CHAPITRE 2

L'AR est un élément important dans l'organisme où il régule l'expression de plusieurs gènes, cependant il reste beaucoup à connaître sur sa synthèse. Nous avons développé un modèle cellulaire afin d'étudier le métabolisme et la synthèse d'AR par une RALDH1. L'enzyme que nous avons cloné des cellules JTC12 est très similaire à l'enzyme RALDH1 humaine. Ces études nous ont permis dans un premier temps de démontrer que les cellules exprimant une RALDH1 endogène pouvaient produire de l'AR à partir d'un substrat RAL et que le produit ne subissait aucune isomérisation. Nous croyons que ces données sont transposables dans un organisme vivant et que l'AR produit provient de l'oxydation d'un isomère de RAL de même conformation isomérique. Deuxièmement, nous avons démontré que la RALDH1 de singe possédait une activité pour la forme 13-*cis* tout comme l'enzyme humaine. Nous supposons que si l'enzyme peut oxyder cette forme c'est qu'elle doit avoir une importance dans l'organisme. Le clonage de cette enzyme RALDH1 de singe nous permettra peut-être d'éclaircir le rôle de cet isomère dans un prochain avenir.

Article 1

Cloning of monkey *RALDH1* and characterization of retinoid metabolism in
monkey kidney proximal tubule cells

Hélène Brodeur, Isabelle Gagnon, Sylvie Mader, Pangala V. Bhat

Journal of Lipids Research

44, 303-313

2003

Cloning of monkey *RALDH1* and characterization of retinoid metabolism in monkey kidney proximal tubule cells

Helene Brodeur[¶], Isabelle Gagnon[¶], Sylvie Mader[§] and Pangala V. Bhat^{¶*}

[¶]Laboratory of Nutrition and Cancer, Centre hospitalier de l'Université de Montreal-Hotel Dieu, [§]Departments of Biochemistry and [¶]Medicine, Université de Montreal, Montreal, Quebec, Canada

*Corresponding author:
Pangala V. Bhat, Ph.D.

Laboratory of Nutrition and Cancer
Research Centre, CHUM-Hotel-Dieu

Montreal, Quebec, Canada H2W 1T8

Tel: (514) 890-8000 Ext. 12927

Fax: (514) 412-7152

e-mail: [REDACTED]

Running footline: Retinal dehydrogenase and retinoid metabolism

Abbreviations: ALDH, aldehyde dehydrogenase; GST, glutathione-S-transferase; HPLC, high pressure liquid chromatography; PBS, phosphate buffered saline; RA, retinoic acid; RALDH1, 2, and 3, retinal dehydrogenase type 1, 2, 3; RAR, retinoic acid receptors; RXR, retinoid X receptors; RT-PCR, reverse transcription-polymerase chain reaction; SDS-PAGE, sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis.

2.1 Abstract

All-*trans* and 9-*cis* retinoic acid function as ligands for retinoic acid receptors (RARs and RXRs), which are ligand-dependent transcription factors and play important roles in development and cellular differentiation. Several retinal dehydrogenases are likely to contribute to the production of all-*trans* and 9-*cis* RAs *in vivo*, but their respective roles in different tissues are still poorly characterized. We have previously characterized and cloned from kidney tissues the rat retinal dehydrogenase type 1 (RALDH1), which oxidizes all-*trans* and 9-*cis* retinal with high efficiency, but is inactive with 13-*cis* retinal. Here we have characterized the retinal-oxidizing activity in monkey JTC12 cells, which are derived from kidney proximal tubules. In vitro assay of cell lysates revealed the presence of a NAD⁺-dependent dehydrogenase that catalyzed the oxidation of all-*trans*, 9-*cis* and 13-*cis* retinal. Northern blot analysis of JTC12 RNAs and cloning by reverse transcription-polymerase chain reaction demonstrated expression of a monkey homolog of RALDH1. Bacterially expressed JTC12 RALDH1 catalyzed conversion of all three retinal isomers, with a higher catalytic efficiency for 9-*cis* retinal than for all-*trans* and 13-*cis* retinal. Accordingly, live JTC12 produced 9-*cis* retinoic acid more efficiently than all-*trans* retinoic acid from their respective retinal precursors. Only metabolites corresponding to the same steric conformation were formed from 9-*cis* or all-*trans* retinal, indicating a lack of detectable isomerizing activity in JTC12 cells.

Supplementary key words: retinoic acid, retinol, retinal, isomers, retinal dehydrogenase type I, retinoid metabolism.

2.2 Introduction

Retinoids are important regulators of cell growth, differentiation and embryonic development (1-3). They are also needed for normal vision, reproduction and immunity (4-6). The biological actions of retinoids are mediated through binding and modulation of retinoic acid receptors (RARs) or retinoid X receptors (RXRs), which function as ligand-dependent transcription factors (7). *All-trans* retinoic acid (RA) is a natural ligand for RARs, and *9-cis* RA binds to both RARs and RXRs (8). The influence of vitamin A (retinol) in the control of gene expression is made possible by enzymes regulating RA synthesis. RA is formed from retinol via a 2-step metabolic pathway that involves oxidation of retinol to retinal and then of retinal to RA (9,10). Although the metabolic pathways leading to the formation of *all-trans* and *9-cis* RAs are beginning to be elucidated, the enzymes controlling production of these compounds within specific cells and tissues are still poorly characterized. In particular, it is not firmly established whether both *all-trans* and *9-cis* RAs can be produced from the precursor *all-trans* retinol. Several studies have shown that externally supplied *all-trans*, *9-cis* and *13-cis* RAs are isomerized into *cis* or *trans* RAs in cells and tissues and appear to reach equilibrium (11-16). Since no isomerase(s) involved in these processes have been identified, it is generally believed that the interconversion of *cis-trans* RA occurs

in cells through non-enzymatic mechanism(s), although it is not clear whether this can happen at the level of retinol, retinal and/or retinoic acid (16,17).

We have previously reported the purification, cloning and characterization of a retinal dehydrogenase (RALDH1) from rat kidney that oxidized all-*trans* and 9-*cis* retinal, but not 13-*cis* retinal to the corresponding acids (18-20). We have also demonstrated that rat RALDH1 is highly expressed in the proximal tubules of the developing kidney, suggesting a role in RA production during tubulogenesis (21). In addition rat RALDH1 is expressed in other tissues such as trachea, intestine, and stomach epithelia, indicating its role in RA production needed for epithelial cell differentiation (22, 23). In human, RALDH1 is highly expressed in kidney and liver tissues (24). On the other hand, in the mouse, RALDH1 is detected in mesonephros of 10 day old embryo but is not expressed in the adult kidney (25).

In the present report, we have characterized the RALDH expressed in a monkey kidney cell line (JTC12) and investigated the production of isomers of RA by these cells. The enzyme cloned was found to be the most homologous to human RALDH1. Its expression in kidney JTC12 cells is consistent with the reported high expression of rat RALDH1 in kidney. In addition, monkey RALDH catalyzed formation of all-*trans*, 9-*cis* or 13-*cis* isomers of RA from the corresponding retinal isomers in vitro, with a 2-fold higher catalytic efficiency for 9-*cis* retinal. Similarly, 9-*cis* RA was formed more efficiently than all-*trans* RA

when JTC12 cells were incubated with all-*trans* or 9-*cis* retinal, respectively, without detectable equilibrium between RA isomers.

2.3 Materials and Methods

2.3.1 Chemicals and reagents

All-*trans*, 9-*cis* and 13-*cis* retinal and all-*trans* and 13-*cis* RAs were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). Standard all-*trans*, 9-*cis* and 13-*cis* retinol were synthesized from corresponding retinal by NaBH₄ reduction as described earlier (26). 9-*cis* RA was obtained from Hoffmann-La Roche (Basel, Switzerland). The purity of the retinal substrates was assessed by reverse and normal phase high pressure liquid chromatography (HPLC) (27) and was found to be at least 99% pure. All HPLC grade solvents were purchased from the Fisher Scientific Company (Toronto, Ontario).

2.3.2 Cell culture

JTC12 (monkey kidney proximal tubule) cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (Gibco BRL) supplemented with 10% (v/v) fetal bovine serum, high glucose and antibiotics, penicillin and streptomycin (Sigma) at 37°C in an incubator containing 5% CO₂.

2.3.3 Northern blot analysis

Expression of RALDH transcripts in JTC12 cells was analyzed by Northern blot essentially as described earlier (22). Total RNAs from cells were isolated with Trizol pure reagent (Gibco BRL) according to the manufacturer's protocol. 10-15 µg of total RNA were separated in 1.1% agarose gels and transferred to a Nytran membrane. The blots were prehybridized and hybridized at 68°C, using Quickhyb reagent (Stratagene, La Jolla, CA). They were then washed twice with 2X SSC, 0.1% SDS at room temperature for 15 min. and then with 0.1X SSC, 0.1% SDS at 50°C for 30 min (low stringent condition). Under high stringent conditions the blots were washed with 0.1X SSC, 0.1% SDS at 65°C for 30 min. Full length rat kidney RALDH cDNA that was labeled with [³²P] dCTP served as a probe.

2.3.4 Immunoblot analysis

For immunoblot analysis, cells and tissues were homogenized in 1.0 ml of 100 mM ice-cold Tris-HCl buffer, pH 8.0, containing 3 mM EDTA and a mixture of protease inhibitors. The homogenate was centrifuged at 10,000 x g to remove debris and unhomogenized materials. The protein present in the supernatant was boiled in sample buffer, separated by 8% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), and transferred to Hybond nitrocellulose (Amersham). Blots were blocked with 0.05% Tween-20 in 5% bovine serum albumin before incubation with antibody. Immunoreactive protein was detected in

an ECL Western blotting system. An antibody raised against rat RALDH1 (peptide corresponding to residues 5-16) (28) (kindly supplied by Dr. James Lipsky, Mayo Clinic Foundation, Rochester, MN) was used in immunoblot analysis.

2.3.5 Cloning of cDNA

Monkey RALDH1 cDNA was cloned from JTC12 total RNA by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). The primers from human RALDH1 sequence were used in RT-PCR (29). The forward and reverse primers consist of the BamH I restriction site and 5'-sequences (oligos 1-20, atgtcatcctcaggcagcc) and an EcoR I restriction site and the reverse complement of 3'-sequences (oligos 1487-1506, ctctcagaagaactcataa) respectively. First strand cDNA was synthesized with 2 µg of RNA from JTC12 cells using M-MLV reverse transcriptase (Gibco BRL) and 3'-primer. This was followed by a PCR that contained both 5'- and 3'-primers and Taq polymerase using Super Script system (Gibco BRL). The PCR product was separated on 1% agarose gel, and a 1.5-kb band was isolated on DE 81 paper. The 1.5-kb PCR product that contained the RALDH open reading frame was sub-cloned into the BamH I and EcoR I sites of the pGEX-2T bacterial expression vector (Pharmacia Biotech). Two clones originating from independent PCR reactions were sequenced.

2.3.6 Recombinant RALDH expression and purification

The RALDH1 clone in pGEX-2T vector was transformed into *E. Coli* BL21 (DE3) and expressed with glutathione-S-transferase (GST) fusion protein at the amino terminus. The expressed protein was purified from crude bacterial extract with a GST affinity column followed by excision with thrombin as described previously (30). The purity of the enzyme was assessed by SDS-PAGE.

2.3.7 RALDH activity assays

Assays for monkey RALDH1 activity were carried out essentially as described previously for rat kidney RALDH1 (31). Cell lysates or tissue extracts were incubated for 60 min at 25°C with an assay mixture (250 µL) containing 10 µM each of all-*trans*, 9-*cis* or 13-*cis* retinal (added in 2.5 µL dimethyl sulfoxide) and 603 µM NAD⁺ in 100 mM phosphate buffer, pH 7.5, containing 0.02% Tween-80 and 161 mM dithiothreitol. To determine the kinetic constants of purified recombinant RALDH, various concentrations of retinal substrates (1-20 µM) were incubated with a fixed amount of enzyme. Immediately after the reactions, the assay mixture was extracted with 400 µL of butanol/acetonitrile (1:1), and the reaction product was analyzed by HPLC. Assays were performed under yellow light or in minimal light to minimize the photoisomerization of retinoids.

2.3.8 Retinoid metabolism by JTC12 cells

Cells at least 70% confluent were used in retinoid metabolism studies. In cytotoxic assays and titration experiments, 2.5 million cells in 10-cm dishes were incubated with 1 μ M, 5 μ M or 10 μ M all-*trans* retinal for 24 h. In later experiments, cells were incubated for 3 h with 10 μ M all-*trans*, 9-*cis* or 13-*cis* retinal. Retinoids were freshly prepared in ethanol, and their purity was checked by UV spectrum and HPLC before their addition to the medium. Formalin-fixed cells served for control incubations with retinoids. After incubations with retinoids, the medium was removed and the cells were washed twice with cold phosphate-buffered saline (PBS). They were then collected from the dish by scraping and suspended in 0.5 ml PBS. Cell lysates were prepared by freezing and thawing 3 times. After gently vortexing for a few seconds, the samples were centrifuged at 2,000 rpm for 15 min at 4⁰C to remove cell debris, and supernatants were collected. Retinal, retinol and RA were extracted from the cell lysates (250 μ L) with butanol/acetonitrile (400 μ L, 1:1). An aliquot was directly injected onto HPLC for the separation and quantification of retinoids. To detect the formation of retinyl esters, the lysates were extracted twice with 3 ml of petroleum ether. Retinyl esters were separated by alumina column chromatography as described earlier (32), and their identities were verified by spectrophotometry and HPLC (33).

2.3.9 HPLC analysis

RA, retinol and retinal were separated on a 4.6 x 250 mm Partisil 10 μ ODS (irregular shaped, 10% carbon loading from Phenomenex, Inc., Torrance, CA) with acetonitrile/water (40:60 v/v) containing 10 mM ammonium acetate as the mobile phase and at a flow rate of 1.2 mL/min. In this HPLC system, *cis*-retinoids are not separated from each other but are separated from their respective *trans*-retinoids. The identity of each *cis*-retinoid isomer (9-*cis* and 13-*cis*) and the formation of retinyl esters were studied in other HPLC systems described earlier (33, 34). Retinoids were detected by absorbance at 330 nm on a Shimatzu LC- 7A liquid chromatography system. Retinoid peaks were identified and quantified by comparing their retention times and integrated areas under the peak against those of known amounts of pure standard retinoids.

2.4 Results

2.4.1 Characterization of the RALDH expressed in JTC12 cells

Northern blot analysis of RNA extracted from JTC12 cells under low stringency conditions using full length rat kidney RALDH1 cDNA as a probe revealed an abundant ~2.2 kb transcript (Fig. 1A). The size of the transcript was slightly higher than that of rat kidney RALDH1 (Fig. 1A, lane 2). However, under high stringency conditions, the probe hybridized with rat RALDH1 but not with the

transcript from JTC12 cells, suggesting differences in primary sequences between the two messenger RNAs. Western blot analysis using anti-rat RALDH1 showed no signal (data not presented), indicating that the peptide sequence of JTC12 ALDH differs from that of rat RALDH1 between amino acids 5-16, the epitope recognized by the antibody. Note however that this antibody does not recognize human RALDH1, due to sequence divergence in this epitope. We next examined whether the JTC12 ALDH transcript hybridizes with other cytosolic ALDHs, such as RALDH2 and RALDH3, which also catalyze retinal oxidation (30, 35). A cDNA probe corresponding to mouse RALDH2 did not hybridize, and a mouse RALDH3 probe recognized only a faint doublet around 3 kb (data not presented), suggesting that the main ALDH found in JTC12 cells is the monkey homolog of the RALDH1.

To test whether the JTC12 ALDH has activity with retinal substrates, we performed retinal dehydrogenase assays in crude cell extracts, using initially all-*trans* retinal as substrate. Similar to rat kidney extracts, the JTC12 cell extracts showed high NAD-dependent RA-synthesizing activity (Fig. 1B). The ability of JTC12 cell extracts to catalyze the oxidation of all-*trans*, 9-*cis* and 13-*cis* retinal was examined to compare the substrate selectivity of the RALDH expressed in these cells with those reported for human, mouse or rat RALDH1. While all three enzymes catalyze oxidation of all-*trans* and 9-*cis* retinal, they differ in their properties with 13-*cis* retinal, which is a substrate only for human RALDH1. The rates of RA production using JTC12 cell extracts were linear to protein

concentrations up to 75 μ g. The RALDH present in these extracts had high activity with 9-*cis* retinal, and slightly lower activity with all-*trans* and 13-*cis* retinal (Fig. 2). Thus, the substrate selectivity of the JTC12 RALDH with 13-*cis* retinal is closer to that of the human enzyme than to those of the rodent enzymes. Together, the results of the Northern/Western experiments and of the enzymatic assays suggest that the RALDH expressed in JTC12 cells is most closely related to human RALDH1 (19,36).

2.4.2 Kinetic properties of the recombinant JTC12 RALDH

Since the initial characterization of the JTC12 RALDH indicated high similarity with human RALDH1, we used 5'- and 3'-primers derived from human ALDH1 in a RT-PCR assay to clone the cDNA corresponding to the monkey enzyme. The cDNA obtained encoded a deduced protein of 500 amino acids (Fig. 3) with closest amino acid identity with human ALDH1 (98.6 %) (29). Monkey RALDH1 also shared 85.6 % and 86.2 % amino acid identity with rat and mouse RALDH1 respectively (Fig. 4) Note that 9 amino acids out of 12 differ between monkey RALDH1 and rat RALDH1 in the N-terminal epitope recognized by the antibody used in Western blotting, explaining its lack of cross-reactivity with JTC12 extracts.

To investigate whether the cloned cDNA expresses a protein with enzymatic properties for retinal oxidation similar to those observed with crude extracts, we

expressed it in an *E. coli* system. The purified recombinant enzyme showed an expected molecular mass of 55 kDa (Fig. 5). The pH optimum of the expressed enzyme for all-*trans* retinal oxidation was 9 (Fig. 6B), similar to the pH optimum of the enzyme characterized in crude extracts (Fig. 6A). Next, we tested the activity of recombinant RALDH for retinal isomer substrates. Similarly to the activity observed in crude cell extracts (Fig. 2), the *E. coli*-expressed enzyme also catalyzed oxidation of the 3 retinal isomer substrates to the respective RAs (data not presented).

To test whether the kinetic properties of recombinant JTC12 RALDH for retinal substrates are similar to those of human ALDH1 (36), we assessed its saturation kinetics with all-*trans*, 9-*cis* and 13-*cis* retinal. The recombinant enzyme exhibited the highest activity for 9-*cis* retinal followed by all-*trans* and 13-*cis* retinal oxidation (Fig. 7). The K_m for 13-*cis* retinal was 2-fold lower than for all-*trans* retinal. However, no significant difference was observed in the catalytic efficiency (V_{max}/K_m) of 13-*cis* and all-*trans* retinal conversion to the respective RAs (Table 1). On the other hand, 9-*cis* retinal showed ~ 2-fold higher catalytic efficiency when compared to all-*trans* retinal oxidation. Overall, the kinetic properties were similar to those of purified human ALDH1 (36).

2.4.3 Metabolism of retinal isomers by JTC12 cells

The presence of trace amounts of retinal, the intermediate in the synthesis of RA from retinol, has been demonstrated in tissues (37). However, little is known about whether stereochemical integrity is maintained in cells during RA metabolism. Since JTC12 cells express high levels of an RALDH that is capable of oxidizing all-*trans*, 9-*cis* and 13-*cis* retinal, metabolic studies performed with these cells should provide valuable information as to the possibility of intracellular conversion between retinal isomers.

In initial experiments, JTC12 cells were incubated for 24 h with various concentrations of all-*trans* retinal (1-10 μ M) to assess the sensitivity of the HPLC assay for detection of RA produced, and the potential toxicity of the retinal substrate. Cell viability was examined by trypan blue exclusion and indicated that the retinal concentrations used were not toxic. Since a dose-dependent increase in RA levels was observed in this range of concentrations (Fig. 8), more detailed metabolic studies were then performed in JTC12 cells using 10 μ M of retinal isomers. The purity of all-*trans*, 9-*cis* and 13-*cis* retinal substrates before incubation was found to be greater than 99% by HPLC analysis (Figure 9, panels A, B and C respectively). All retinoid-containing solutions were prepared in the dark just before incubation. The typical HPLC profiles of the lipid extracts from cells incubated with all-*trans*, 9-*cis* or 13-*cis* retinal for 3 h are presented in Figure 9, panels D, E and F respectively. The cells took up all-*trans* retinal from

the medium and converted it into either all-*trans* retinol or all-*trans* RA (Fig. 9D, peaks 2 and 4), while no *cis* isomers of retinol or RA were detected. Interestingly, we did not detect retinal in cell extracts, indicative of its complete metabolism. Similarly, 3 h of incubation with 9-*cis* retinal resulted in the formation of 9-*cis* RA by the cells (Fig. 9E, peak 1), and neither all-*trans* RA nor all-*trans* retinal were produced. Note that 9-*cis* retinol was not detected either. In parallel experiments, cells pre-treated with formaldehyde for 1 min (dead cells) did not produce any metabolites of all-*trans* or 9-*cis* retinal, indicating that metabolites were formed in the cells. On the other hand, the metabolic profile of 13-*cis* retinal showed formation of all-*trans* RA, all-*trans* retinol and all-*trans* retinal with no 13-*cis* RA or 13-*cis* retinol (Fig. 9F), while trace amounts of 13-*cis* retinal were still present in the cells (Fig. 9F, peak 7). Since mainly all-*trans* retinoid metabolites were present in cells incubated with 13-*cis* retinal, one possibility is that most of the 13-*cis* retinal might have been isomerized non specifically in the medium to all-*trans* retinal, and that all-*trans* retinal might have been preferentially taken up by the cells and metabolized to the respective RA or retinol. To explore this possibility, we incubated formalin-fixed cells with 13-*cis* retinal and analyzed the retinoids extracted from the medium. Indeed, more than 45% of 13-*cis* retinal was isomerized to all-*trans* retinal in the medium at 3 h of incubation (data not shown). At present, we have not succeeded in keeping the integrity of the steric configuration of 13-*cis* retinal in the incubation medium, thus preventing assessment of the metabolism of 13-*cis* retinal in JTC12.

Although the presence of retinyl esters was not routinely examined, because of the need to use relatively tedious chromatographic systems to separate and quantify the isomers of retinyl esters, alumina chromatography and HPLC analysis demonstrated the presence of retinyl esters in cells incubated with all 3 retinal isomers (data not shown), indicating that JTC12 cells express retinyl esterases and store retinol in the form of retinyl esters.

The levels of all-*trans* or 9-*cis* RA or retinol formed in cells incubated for 3 h with all-*trans* or 9-*cis* retinal, respectively, is illustrated in Figure 10. At 3 h of incubation, the cellular levels of 9-*cis* RA were 5-fold higher than of all-*trans* RA, while all-*trans* retinol accumulated more than 9-*cis* retinol over the same time period. This higher efficiency in the conversion of 9-*cis* retinal to RA than of the all-*trans* isomer is consistent with the *in vitro* properties of the monkey RALDH1.

2.5 Discussion

Although a wealth of information is available on the role of retinoid receptors in retinoid signaling, less is known about the metabolic pathways involved in the biosynthesis of RA isomers in target tissues. To analyze the biosynthetic pathways of retinoid isomers in an intact cell system, we characterized the RA synthetic enzyme expressed in a kidney-derived cell line, JTC12. The expression levels and activity for the three retinal isomers of the RALDH enzyme expressed

in JTC12 cells suggested that JTC12 is a good model to explore the biosynthesis of RA isomers in a cellular environment.

We have previously reported the kinetic properties of several RALDHs for retinal isomer substrates (19,30,36), and characterized the amino acid regions that are important for all-*trans* and 9-*cis* retinal oxidation (38). The observation that the JTC12 RALDH activity catalyzed the oxidation of the three retinal isomer substrates (Fig. 2), and the lack of hybridization with a probe for RALDH2, which also oxidizes the three retinal isomers (30), indicated that this activity is most similar to human ALDH1 (36). This homology was confirmed by sequencing of the cloned cDNA (Fig. 3), and the properties of the recombinant enzyme, such as molecular mass (Fig. 5), pH optimum (Fig. 6) and kinetic constants (Fig. 7, Table 1), were found to be very similar to those of human ALDH1 (36). Furthermore, the transcript (~2.2 kb) that hybridized with rat kidney RALDH1 cDNA at low stringency (Fig. 1) hybridized strongly with the cloned cDNA under high stringency conditions (data not shown), confirming that the cloned monkey RALDH1 is indeed the retinal dehydrogenase expressed to high levels in JTC12 cells.

One aspect of retinoid signaling that is not yet clear is the metabolic route of all-*trans*, 9-*cis* and 13-*cis* RA formation *in vivo*. It is generally accepted that all-*trans* retinol is the main precursor retinoid for the formation of RAs *in vivo* (39). Note in addition that while it is generally believed that all-*trans* and 13-*cis* RA are

naturally-occurring retinoid forms (17,38), the occurrence of 9-*cis* RA in tissues and cells is still disputed (8,40-43). However, the existence of 9-*cis* and 13-*cis* retinol has been documented (19, 39). Several enzymes involved in the first oxidation step of the RA biosynthetic pathway have been shown to catalyze the oxidation of all-*trans*, 9-*cis* and 13-*cis* retinol to the respective retinals (9,10,44). In the second step of RA synthesis, retinal is oxidized by at least 3 types of NAD⁺-dependent RALDHs differing in tissue expression and catalytic efficiencies for retinal isomers (9). Enzymatic assays have clearly demonstrated that the retinoids maintain their steric configuration during the oxidation process of retinol to RA *in vitro* using either pure or recombinant enzymes (19,30,39). However, the metabolism of retinoids within tissues and cells is complex. Retinol taken up by the cells undergoes various metabolic transformations that include esterification to retinyl esters, activation to RA, and conjugation to glucuronic acid (9,10,45). Since JTC12 cells constitutively express high levels of an RALDH activity that catalyzes oxidation of all three retinal isomers into the corresponding RA isomers *in vitro*, we wanted to characterize the metabolites formed from each isoform of retinal and to assess whether isomerization can occur in live JTC12 cells.

HPLC analysis of cell extracts incubated with retinal isomers showed a dose-dependent production of RA produced in JTC12 cells (Fig 8). Although retinal can form Schiff's bases with groups of proteins and amino acids (46), no cytotoxicity was observed at the concentrations used. In addition to oxidation to

RA, all-*trans* retinal was also reduced to retinol (Fig. 9, peak 4) and subsequently esterified (data not included), suggesting the presence of retinol reductase and esterase in JTC12 cells. Since the first metabolic conversion of retinol to RA is a reversible reaction, the reductase may well represent a retinol dehydrogenase (10). Several investigators have reported that reduction to retinol and subsequent esterification to retinyl esters are the main metabolic products of administered retinal isomers in cells and tissues (39,47). However, no retinol was detected after a 3h incubation period with 9-*cis* retinal, while high levels of 9-*cis* RA were produced compared to all-*trans* RA (Fig. 10A), consistent with the substrate selectivity observed with recombinant RALDH1 *in vitro* (Fig. 7, Table 1). It is interesting that neither all-*trans* or 9-*cis* retinal was detectable in the cells (Fig. 9D and E), indicating rapid exhaustion of the substrate by oxidative and reductive enzymes.

In vivo, retinal is formed either from the oxidation of retinol or cleavage of β -carotene. However, the bulk of retinal generated from β -carotene is converted to retinol and then to retinyl esters, which are stored in peripheral target cells, or in the case of intestinal uptake, are transported by chylomicrons to the liver and subsequently stored in stellate cells (48). The rates of cleavage of 9-*cis* and 13-*cis* β -carotene are slower than that of the all-*trans* isomer (49). This may affect the rates of conversion of retinal isomers, formed from carotenoid precursors, to either retinol or RA. In addition, the expression levels and the substrate specificities of RALDHs and reductases may influence the metabolism of retinal

isomers. Our experiments on retinal metabolism by JTC12 cells support the notion that the synthesis of either RA or retinol from retinal depends on the relative activities and specificities of RALDHs and retinal reductases for retinal substrates. Since retinal does not exist in free form in the cells, it is likely that retinal taken up by the cells is metabolized rapidly either to RA or retinol.

A recent study demonstrated that all-*trans* RA is a major metabolite of 13-*cis* retinal in pregnant rats supplemented with 13-*cis* retinal (47). We also observed production of all-*trans* metabolites in JTC12 cells incubated with 13-*cis* retinal, but this isomerization could be attributed to the significant conversion of 13-*cis* retinal to all-*trans* retinal in culture media (Fig. 9F). To examine whether 13-*cis* retinal maintains its steric configuration during metabolic conversion in the cells requires methods to stabilize it during incubation. Nevertheless, this problem was not encountered with all-*trans* or 9-*cis* retinal, which were converted to their respective metabolites without detectable isomerization by live JTC12 cells (Fig. 9). Several studies have shown that isomerization of the *trans* and *cis* isomers of externally provided RAs varies between 2-15% of total RA in tissues, cells and microsomal extracts (11-15). Note that the detection limit of RAs in our HPLC systems is 1 pmol, which represents about 7.5% of the all-*trans* RA and 1.5% of the 9-*cis* RA produced in an assay of JTC12 cell extracts after *in vivo* incubation (Fig. 10A). Thus if conversion of 9-*cis* to all-*trans* RA takes place in JTC12 cells, it occurs with very low efficiency. These observations are consistent with the findings of Sass et al. (47) and Kraft et al. (50), who reported that all-*trans* and 9-

cis RA are the predominant *in vivo* metabolites of administered all-*trans* and 9-*cis* retinal, respectively. Furthermore, Liu et al. (51) demonstrated that parathyroid cells do not convert all-*trans* RA to 9-*cis* RA, but synthesize 9-*cis* RA from all-*trans* retinol. Taken together, these observations suggest that RA isomers are generated in target cells from different precursor retinoids rather than by isomeric exchange. Future studies directed towards the generation and use of selective retinal isomer-oxidizing enzymes (38) in *in vitro* transfection protocols as well as in an *in vivo*-expressing transgenic mouse system should provide greater insights into the formation and metabolic conversion of RAs.

2.6 Acknowledgements

This work was supported by a grant from the Canadian Institutes of Health Research (MOP-36485) to PVB and SM. We thank Sharmeen Nusrat for excellent technical assistance and Ovid M. Da Silva for editing our manuscript.

2.7 References

1. Strickland, S., and M. J. Sawey. 1980. Studies on the effect of retinoids on the differentiation of teratocarcinoma stem cells *in vitro* and *in vivo*. *Dev Biol.* 78: 76-85.
2. Gudas, L. J., M. B. Sporn, and A. B. Roberts. 1994. Cellular biology and chemistry of the retinoids. In *The Retinoids: Biology, Chemistry, and Medicine*. M. B. Sporn, A. B. Roberts, and D. S. Goodman, editors. Raven Press Ltd, New York, 443-520.

3. Hofmann, C., and G. Eichele. 1994. Retinoids in development. In *The Retinoids: Biology, Chemistry, and Medicine*. M. B. Sporn, A. B. Roberts, and D. S. Goodman, Editors. Raven Press Ltd, New York, 319-350.
4. Saari, J. C. 1994. Retinoids in photosensitive systems. In *The Retinoids: Biology, Chemistry, and Medicine*. M. B. Sporn, A. B. Roberts, and D. S. Goodman, editors. Raven Press Ltd, New York, 351-386.
5. Armstrong, R. B., K. O. Ashenfelter, C. Eckhoff, A. A. Levin, and S. S. Shapiro. 1994. General and reproductive toxicology of retinoids. In *The Retinoids: Biology, Chemistry, and Medicine*. M. B. Sporn, A. B. Roberts, and D. S. Goodman, editors. Raven Press Ltd, New York, 545-572.
6. Ross, A. C., and U. Hammerling. 1994. Retinoids and the immune system. In *The Retinoids: Biology, Chemistry, and Medicine*. M. B. Sporn, A. B. Roberts, and D. S. Goodman, editors. Raven Press Ltd, New York, 521-544.
7. Chambon, P. 1996. A decade of molecular biology of retinoic acid receptors. *FASEB J.* 10: 940-954.
8. Mangelsdorf, D. J., K. Umesono, and R. M. Evans. 1994. The retinoid receptors. In *The Retinoids: Biology, Chemistry, and Medicine*. M. B. Sporn, A. B. Roberts, and D. S. Goodman, editors. Raven Press Ltd, New York, 319-349.
9. Duester, G. 2000. Families of retinoid dehydrogenases regulating vitamin A function: production of visual pigment and retinoic acid. *Eur. J. Biochem.* 267: 4315-4324.
10. Napoli, J. L. Retinoic acid: its biosynthesis and metabolism. 2000. *Prog. Nucleic Acid Res.* 63: 139-188.
11. Sundaresan, P. R., and P. V. Bhat. 1982. Ion-pair high-pressure liquid chromatography of cis-trans isomers of retinoic acid in tissues of vitamin A sufficient rats. *J. Lipid Res.* 23: 448-455.
12. Cullum, M. E., and M. H. Zile. 1985. Metabolism of all-trans retinoic acid and all-trans retinyl acetate: demonstration of common physiological metabolites in rat small intestinal mucosa and circulation. *J. Biol. Chem.* 260: 10590-10596.
13. Bhat, P. V., and A. M. Jetten. 1987. Metabolism of all-trans retinol and all-trans retinoic acid in rabbit tracheal epithelial cells in culture. *Biochim. Biophys. Acta.* 922: 18-27.

14. Kojima, R., T. Fujimore, N. Kiyota, Y. Toriya, T. Fukuda, T. Ohashi, T. Sato, Y. Yoshizawa, K. I. Takeyama, H. Mano, S. Masushige, and S. Kato. 1994. In vivo isomerization of retinoic acids: rapid isomer exchange and gene expression. *J. Biol. Chem.* 269: 32700-32707.
15. Urbach, J., and R. R. Rando. 1994. Isomerization of all-trans retinoic acid to 9-cis retinoic acid. *Biochem. J.* 299: 459-465.
16. Disdier, B., M. N. Marchetti, H. Bun, M. Placidi, and A. Durand. 2000. Kinetics of plasma and tissue distribution of 9-cis retinoic acid in rats. *Skin Pharmacol. Appl. Physiol.* 13: 9-16.
17. Blaner, W. S. 2001. Cellular metabolism and actions of 13-cis retinoic acid. *J. Am. Acad. Dermatol.* 45: S129-135.
18. Labrecque, J., P. V. Bhat, and A. Lacroix. 1993. Purification and partial characterization of a rat kidney aldehyde dehydrogenase that oxidizes retinal to retinoic acid. *Biochem. Cell. Biol.* 71: 85-89.
19. Labrecque, J., F. Dumas, A. Lacroix, and P. V. Bhat. 1995. A novel isozyme of aldehyde dehydrogenase specifically involved in the biosynthesis of 9-cis and all-trans retinoic acid. *Biochem. J.* 305: 681-684.
20. Bhat, P. V., J. Labrecque, J-M. Boutin, A. Lacroix, and A. Yoshida. 1995. Cloning of a cDNA encoding rat aldehyde dehydrogenase with high activity for retinal oxidation. *Gene.* 166: 303-306.
21. Bhat, P. V., M. Marcinkiewicz, Y. Li, and S. Mader. Changing patterns of renal retinal dehydrogenase expression parallel nephron development in the rat. 1998. *J. Histochem. Cytochem.* 46: 1025-1032.
22. Bhat, P. V. 1998. Retinal dehydrogenase gene expression in stomach and small intestine of rats during postnatal development and in vitamin A deficiency. *FEBS Lett.* 426: 260-262.
23. Frota-Ruchon, A., M. Marcinkiewicz, and P. V. Bhat. 2000. Localization of retinal dehydrogenase type 1 in the stomach and intestine. *Cell Tissue Res.* 302: 397-400.
24. Ambroziak, W., I. Gonzalo, and R. Pietruszko. 1999. Metabolism of retinaldehyde and other aldehydes in soluble extracts of human liver and kidney. *J. Biol. Chem.* 274: 33366-33373.
25. Haselbeck, R. J., H. Ines, and G. Duyster. 1999. Distinct functions for Aldh1 and Raldh2 in the control of ligand production for embryonic retinoid signaling pathways. *Dev. Genet.* 25: 353-364.

26. Bhat, P. V., H. T. Co, and A. Lacroix. 1983. Effect of 2-alkanols on the separation of geometric isomers of retinol in non-aqueous high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* 260: 129-134.
27. Bhat, P. V., and P. R. Sundaresan. 1988. High-performance liquid chromatography of vitamin A compounds. *CRC Critical Rev. Anal. Chem.* 20: 197-219.
28. Kathmann, E. C., S. Naylor, and J. J. Lipsky. 2000. Rat liver constitutive and phenobarbital-induced cytosolic aldehyde dehydrogenases are highly homologous proteins that function as distinct isozymes. *Biochemistry.* 39: 11170-11176.
29. Strausberg, R. 2000. Homo sapiens aldehyde dehydrogenase 1 family, member A1 (ALDH1A1) mRNA. GenBank accession no. gi: 4502030.
30. Gagnon, I., G. Duester, and P. V. Bhat. 2002. Kinetic analysis of mouse retinal dehydrogenase type-2 (RALDH2) for retinal substrates. *Biochim. Biophys. Acta.* 1506: 156-162.
31. Bhat, P. V., L. Poissant, and A. Lacroix. 1998. Properties of retinal-oxidizing enzyme activity in rat kidney. *Biochim. Biophys. Acta.* 967: 211-217.
32. Bhat, P. V., L. M. De Luca, S. Adamo, I. Akalovsky, C. S. Silverman-Jones, and G. L. Peck. 1979. Retinoid metabolism in spontaneously transformed mouse fibroblasts (Balb/c 3T12-3 cells): enzymatic conversion of retinol to anhydroretinol. *J. Lipid Res.* 20: 357-362
33. Bhat, P. V., L. M. De Luca, and M. L. Wind. 1980. Reverse phase high-pressure liquid chromatographic separation of retinoids, including retinylphosphate and mannosylretinylphosphate. *Anal. Biochem.* 102: 243-248.
34. Bhat, P. V., and A. Lacroix. 1986. Separation of geometric isomers of retinol and retinoic acid in non-aqueous high-performance liquid chromatography. In *Methods in Enzymology*, F. Chytil, and D. B. McCormick, editors. Academic Press, Orlando, 123: 75-85.
35. Grün, F., Y. Hirose, S. Kawauchi, T. Ogura, and K. Umesono. 2000. Aldehyde dehydrogenase 6, a cytosolic retinaldehyde dehydrogenase prominently expressed in sensory neuroepithelia during development. *J. Biol. Chem.* 275: 41210-41218.

36. Bhat, P. V., and H. Samaha. 1999. Kinetic properties of the human liver cytosolic aldehyde dehydrogenase for retinal isomers. *Biochem. Pharmacol.* 57: 195-197.
37. Ito, Y. L., M. Zile, M. Ahrens, and H. F. De Luca. 1978. Liquid-gel partition chromatography of vitamin A compounds in biological samples: formation of retinoic acid from retinyl acetate. *J. Lipid Res.* 15: 517-521.
38. Montplaisir, V., N. Chow Lan, J. Guimond, C. Savineau, P. V. Bhat, and S. Mader. 2002. Recombinant class I aldehyde dehydrogenases specific for all-trans or 9-cis retinal. *J. Biol. Chem.* 277: 17486-17492.
39. Paik, J., S. Vogel, R. Piantedosi, A. Sykes, W. S. Blaner, and K. Swisshelm. 2000. 9-cis-retinoids: biosynthesis of 9-cis retinoic acid. *Biochemistry.* 39: 8073-8084.
40. Werner, W. A., and H. F. De Luca. 2001. Metabolism of a physiological amount of all-trans-retinol in vitamin A-deficient rats. *Arch. Biochem. Biophys.* 393: 262-270.
41. Ulven, S. M., T. E. Gundersen, A. K. Sakhi, J. V. Glover, and R. Blomhoff. 2001. Quantitative axial profiles of retinoic acid in the embryonic mouse spinal cord. *Dev. Dyn.* 222: 341-353.
42. Ulven, S. M., T. E. Gundersen, M. S. Weedon, V. O. Landaas, A. K. Sakhi, S. H. Fromm, B. A. Geronimo, J. O. Moskaug, and R. Blomhoff. 2000. Identification of endogenous retinoids, enzymes, binding proteins, and receptors during early postimplantation development in mouse: important role of retinal dehydrogenase type 2 in synthesis of all-trans-retinoic acid. *Dev. Biol.* 220: 379-391.
43. Horton, C., and M. Maden. 1995. Endogenous distribution of retinoids during normal development and teratogenesis in mouse embryo. *Dev. Dyn.* 202: 312-323.
44. Mertz, J. R., E. Shang, R. Piantedosi, S. Wei., D. J. Wolgemuth, and W. S. Blaner. 1997. Identification and characterization of a stereospecific human enzyme that catalyzes 9-cis retinol oxidation. *J. Biol. Chem.* 272: 33125-33131.
45. Blaner, W. S., and J. A. Olson. 1994. Retinoid and retinoic acid metabolism. In *The Retinoids: Biology, Chemistry, and Medicine*. M. B. Sporn, A. B. Roberts, and D. S. Goodman, editors. Raven Press Ltd, New York, 229-255.

46. Nathans, J. 1990. Determinants of visual pigment absorbance: identification of the retinylidene Schiff's base counterion in bovine rhodopsin. *Biochemistry*. 29: 9746-9752.
47. Sass, J. O., G. Tzimas, M. A. E. Mohamed, and H. Nau. 1999. Metabolism of retinaldehyde isomers in pregnant rats: 13-*cis* and all-*trans*-retinaldehyde, but not 9-*cis* retinaldehyde, yield very similar patterns of retinoid metabolites. *Drug. Metab. Dispos.* 27: 317-321.
48. Olson, J. A. 1964. The biosynthesis and metabolism of carotenoids and retinol (vitamin A). *J. Lipid Res.* 5: 281-299.
49. Nagao, A. and J. A. Olson. 1994. Enzymatic formation of 9-*cis*, 13-*cis*, and all-*trans* retinals from isomers of β -carotene. *FASEB J.* 8: 968-973.
50. Kraft, J. C., D. Kimelman, and M. R. Juchau. 1995. *Xenopus laevis*: a model system for the study of embryonic retinoid metabolism. I. Embryonic metabolism of 9-*cis*- and all-*trans* retinals and retinols to their corresponding acid forms. *Drug. Metab. Dispos.* 23: 72-82.
51. Liu, W., P. Hellman, Q. Li, W.-R. Yu, C. Juhlin, H. Nordlinder, O. Rollman, G. Akerstrom, H. Törmä, and H. Melhus. 1996. Biosynthesis and function of all-*trans*- and 9-*cis*-retinoic acid in parathyroid cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 229: 922-929.

2.8 Figure legends

Figure 2.1. A: Northern analysis of total RNA (10 μ g) from JTC12 cells (lane 1) and adult rat kidney (lane 2). The blot was hybridized under low stringent conditions as described in Materials and Methods. B: Retinal-oxidizing activity in extracts from JTC12 cells and adult rat kidney. 75 μ g of crude protein extract and 10 μ M of all-*trans* retinal were used in the assay.

Figure 2.2. Rates of RA synthesis from 9-*cis* (●), all-*trans* (■) or 13-*cis* (▲) retinal with increasing protein concentrations

Various concentrations of crude protein extract from JTC12 cells were incubated with 10 μ M of retinal isomers at 25⁰C for 1 h. Each point in the curve represents the average of triplicate values.

Figure 2.3. Nucleotide and deduced amino acid sequences of the monkey RALDH1 open reading frame

The amino acids that are different from human ALDH1 are indicated in bold. Sequence data have been deposited with the GenBank accession number AF542418.

Figure 2.4. Comparison of amino acid sequences of monkey RALDH1 (moRALDH1) with other ALDH family members

Sequence identity between ALDHs is indicated by dashes. hALDH1, rRALDH1, mRALDH1 represent human, rat and mouse RALDHs respectively. Sequences were obtained from GenBank accession number, hALDH1 NM000689; rRALDH1 L42009 and mRALDH1 NM 013467.

Figure 2.5. Expression of monkey RALDH1 in *E. coli*

Lane 1, Molecular weight markers; 2, bacterial lysate transfected with the empty vector; 3 and 4 whole bacterial extracts from BL21 (DE3) cells transformed with the pGEX-2T-RALDH1 expression vector and purified enzyme by glutathion-

Sephacrose followed by excision with thrombin respectively. Proteins (6 μ g) were loaded on an SDS-polyacrylamide gel (10 %) and visualized by 0.05% Coomassie Brilliant blue.

Figure 2.6. The pH optimum for all-*trans* RA synthesis is similar for native and recombinant monkey RALDH1

35 μ g and 0.6 μ g respectively of crude extract (A) and pure recombinant proteins (B) were used in the assay. The reaction was performed with 10 μ M all-*trans* retinal. Each point is the average of triplicate values. (■) Phosphate buffer 0.1 mM, pH 7-8; (●) Tris-HCl buffer 0.1 mM, pH 7.5-9.0; (▲) Bicarbonate buffer 0.1 mM, pH 9-11.

Figure 2.7. Saturation kinetics of recombinant monkey RALDH1 for retinal isomers

Assays were performed with 0.4 μ g recombinant protein. (●) 9-*cis*; (■) all-*trans*; and (▲) 13-*cis* retinal. Each point in the curves represents the average of 3 replicates.

Figure 2.8. Levels of RA synthesized in JTC12 cells incubated with various concentrations of all-*trans* retinal

All-*trans* retinal was added to the culture medium in 5 μ l (0.1 % final concentration in medium) ethanol and incubated for 24 h. RA was extracted from the cells and analyzed by HPLC as described in Materials and Methods.

Figure 2.9. Representative HPLC chromatograms of standard retinal isomers (upper panel) and their metabolites generated in JTC12 cells (lower panel)

Arrows 5, 6 and 7 indicate the elution positions as well as the purity of the all-*trans* (A), 9-*cis* (B) and 13-*cis* (C) retinal standards that were used in the metabolic studies. D, E, and F represent the metabolic profiles of cells incubated with all-*trans*, 9-*cis*, and 13-*cis* retinal for 3 h respectively. Arrow 1 represents the elution position of 9-*cis* and 13-*cis* RA; 2, all-*trans* RA; 3, 9-*cis* and 13-*cis* retinol; 4, all-*trans* retinol.

Figure 2.10. Biosynthesis of RA and retinol from retinal precursors in JTC12 cells

JTC12 cells were grown in medium supplemented with 10 μ M all-*trans* or 9-*cis* retinal for 3 h. RA (A) or retinol (B) metabolites were measured by HPLC. The results represent the mean value of triplicate experiments.

Table I

Substrate specificities of recombinant RALDH of JTC12 cells for retinal isomers

Retinal isomers	K _m (μ M)	V _{max} (nmol/min/mg)	V _{max} /K _m (μ M)
All-trans	3.21	14.08	4.49
9-cis	2.63	24.15	9.19
13-cis	1.51	9.35	6.22

cDNA for RALDH was isolated from JTC12 cells and expressed in *E. coli*. The recombinant protein was purified as described in Materials and Methods. The kinetic constants represent the average of 2 or more independent determinations where each point in the curve of each experiment is the average of 3 replicates.

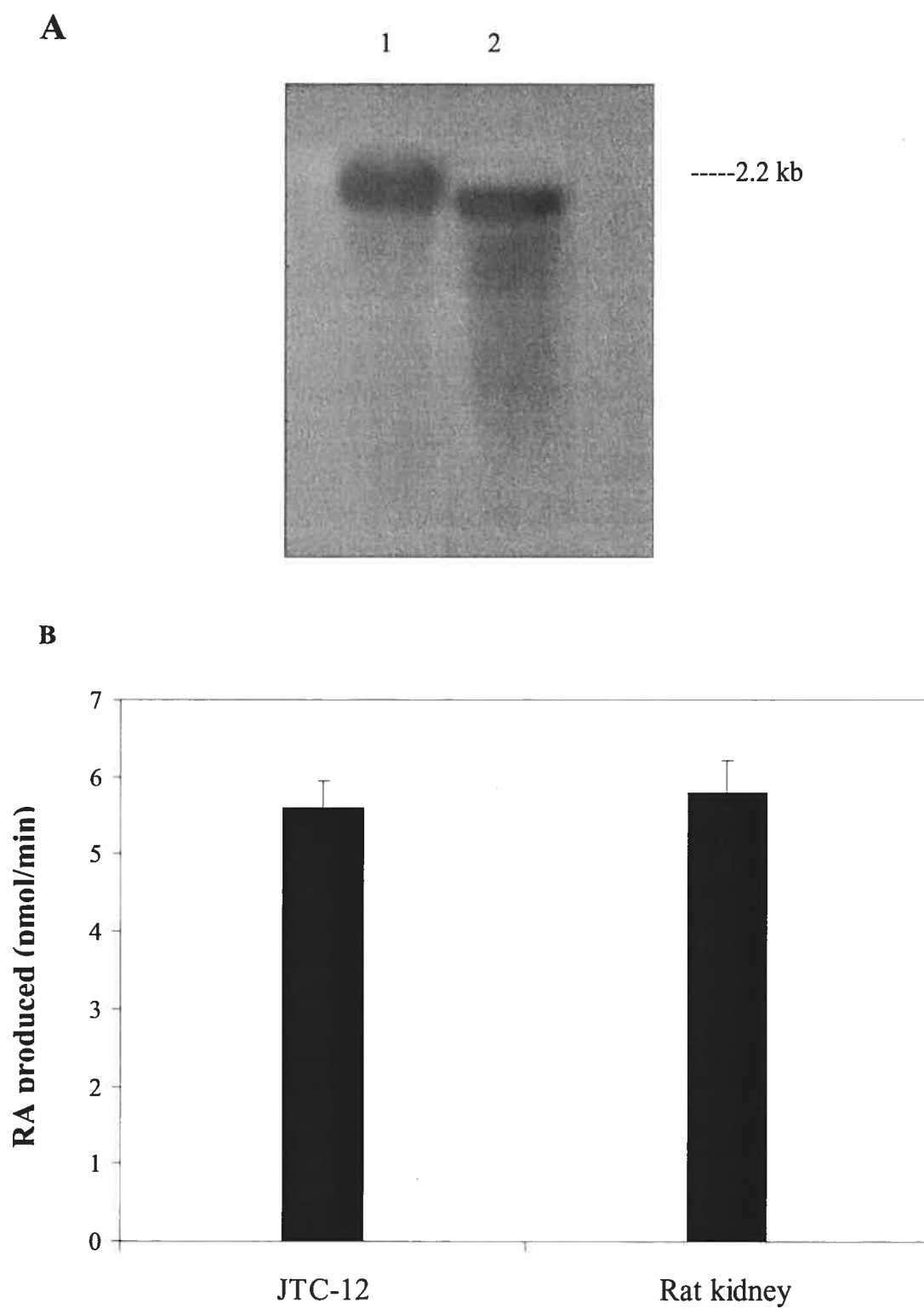
Figure 2.1

Figure 2.2

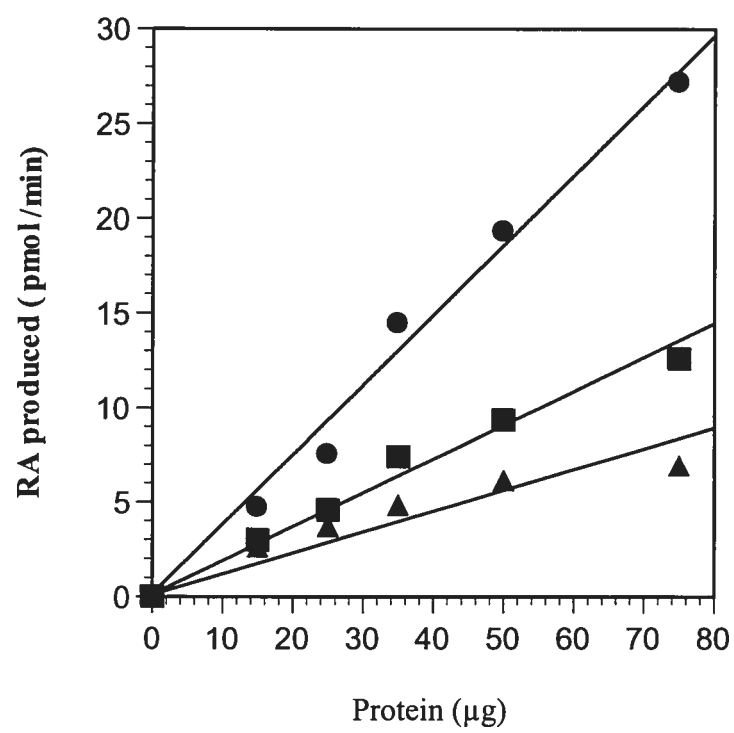


Figure 2.3

```

1   ATGTCATCCTCAGGCACGTCAGACTTACCTGTCCTACCTACCGATTTGAAGATTCAATAT
    M S S S G T S D L P V L P T D L K I Q Y      20
61  ACTAAGATCTTCATAAACAATGAATGGCATGATTCAGTGAGTGGCAAGAAATTCCTGTG
    T K I F I N N E W H D S V S G K K F P V      40
121 TTTAATCCTGCAACTGAGGAGGAGCTCTGCCAGGTAGAAGAAGGAGATAAGGCAGATGTT
    F N P A T E E E L C Q V E E G D K A D V      60
181 GACAAGGCAGTGAAGGCTGCAAGACAGGCTTTCCAGATTGGATCTCCATGGCGTACTATG
    D K A V K A A R Q A F Q I G S P W R T M      80
241 GATGCTTCTGAGAGGGGACGACTATTATACAAGTTGGCTGATTTAATCGAAAGAGATCGT
    D A S E R G R L L Y K L A D L I E R D R      100
301 CTGCTCCTGGCGACAATGGAGTCAATGAATGGTGGAAAACCTCTATTCCAATGCATATCTG
    L L L A T M E S M N G G K L Y S N A Y L      120
361 AATGATTTAGCAGGCTGCATCAAAACATTGCGCTACTGTGCAGGTTGGGCTGACAAGATC
    N D L A G C I K T L R Y C A G W A D K I      140
421 CAGGGCCGTACAATACCAATTGATGGAAACTTTTACATATACAAGACATGAACCTATT
    Q G R T I P I D G N F F T Y T R H E P I      160
481 GGTGTATGTGGCCAAATCATTCTTGGAAATTTCCCGTTGGTTATGCTCATTGGAAGATA
    G V C G Q I I P W N F P L V M L I W K I      180
541 GGGCCTGCACTGAGCTGTGGAACACAGTGGTTGTCAAACCAGCAGAGCAAACCTCTCTC
    G P A L S C G N T V V V K P A E Q T P L      200
601 ACTGCCCTCCACGTGGCATCTTTAATAAAGAGGCAGGGTTTCCTCCTGGAGTAGTGAAT
    T A L H V A S L I K E A G F P P G V V N      220
661 ATTGTTCTGTTATGGGCCTACAGCAGGGGCAGCCATTTCTCCCATGATATAGAC
    I V P G Y G P T A G A A I S S H M D I D      240
721 AAAGTAGCCTTCACAGGATCGACAGAGGTCGGCAAGTTGATCAAAGAAGCTGCCGGGAAA
    K V A F T G S T E V G K L I K E A A G K      260
781 AGCAATCTGAAGAGGGTGACTCTGGAGCTGGGAGGAAAGAGCCCTTGCAITGTGTAGCT
    S N L K R V T L E L G G K S P C I V L A      280
841 GATGCTGACTTGGACAATGCTGTTGAATTTGCACACCATGGGGTGTTCTACCACCAGGGC
    D A D L D N A V E F A H H G V F Y H Q G      300
901 CAGTGTGTATAGCCGCATCCAGGATTTTTGTGGAAGAATCAATTTATGACGAGTTTGTT
    Q C C I A A S R I F V E E S I Y D E F V      320
961 CGAAGGAGTGTTGAGCGGGCTAAGAAGTATATCCTTGGAATCCTCTGACCCCAGGAGCT
    R R S V E R A K K Y I L G N P L T P G A      340
1021 ACTCAAGGCCCTCAGATTGACAAGGAACAATATGATAAAATACTTGACCTCATTGAGAGT
    T Q G P Q I D K E Q Y D K I L D L I E S      360
1081 GGGGAAGAAAGAAGGGGCCAAACTGGAATGTGGAGGAGGCCCGTGGGGGAATAAAGGCTAT
    G K K E G A K L E C G G G P W G N K G Y      380
1141 TTTGTCCAGCCCACGGTGTCTCTAATGTTACAGATGAGATGCGCATTGCCAAAGAGGAG
    F V Q P T V F S N V T D E M R I A K E E      400
1201 ATTTTGGACCAGTGCAGCAAATCATGAAGTTTAAATCTTTAGATGACGTGATCAAAGA
    I F G P V Q Q I M K F K S L D D V I K R      420
1261 GCAAACAATACTTTCTATGGCTTATCGGCAGGAGTCTTTACCAATGACATTGATAAAGCC
    A N N T F Y G L S A G V F T N D I D K A      440
1321 GTAACCATCTCCTCTGCTCTGCAGGCAGGAACAGTGTGGGTGAATTGCTATGGCGTGGTA
    V T I S S A L Q A G T V W V N C Y G V V      460
1381 ACTGCCCAGTGTCCCTTTGGTGGATTCAAGATGTCTGGAATGGACGAGAAGTGGGAGAG
    T A Q C P F G G F K M S G N G R E L G E      480
1441 TACGGTTTCCATGAATACACAGAGGTCAAACAGTCACGGTGAAAATCTCTCAGAAGAAC
    Y G F H E Y T E V K T V T V K I S Q K N      500
1501 TCATAA
    S *

```

Figure 2.4

```

moRALDH1 MSSSGTSDLP VLPTDLKIQY TKIFINNEWH DSVSGKKFPV FNPATEEELC 50
hALDH1      -----P--- --L-----
rRALDH1     ---PAQPAV- APLAN---H-----L-----VI-
mRALDH1     ---PAQPAV- APLA----H-----N-----L-----VI-

moRALDH1 QVEEGDKADV DKAVKAARQA FQIGSPWRTM DASERGRLLY KLADLIERDR 100
hALDH1      -----E-----
rRALDH1     H-----N----M---
mRALDH1     H-----N-----M---

moRALDH1 LLLATMESMN GGKLYSNAYL NDLAGCIKTL RYCAGWADKI QGRTIPIDGN 150
hALDH1      -----
rRALDH1     -----I-AI- ---VFA---S--G-S--A-K-----H-Q---S--D
mRALDH1     -----AL- ---VFA---S--G---A-K-----H-Q---S--D

moRALDH1 FFTYTRHEPI GVCQGIIIPWN FPLVMLIWKI GPALSCGNTV VVKPAEQTPL 200
hALDH1      -----
rRALDH1     I--F--R--- --L-F---
mRALDH1     I-----R--- --ML-F---

moRALDH1 TALHVASLIK EAGFPPGVVN IVPGYGPTAG AAISSHMDID KVAFTGSTEV 250
hALDH1      -----
rRALDH1     ---M-----V-----Q-
mRALDH1     ---L-----V-----Q-

moRALDH1 GKLIKEAAGK SNLKRVTTLEL GGKSPCIVLA DADLDNAVEF AHHG VFYHQG 300
hALDH1      -----
rRALDH1     -----F-----I-----
mRALDH1     -----F-----I-----

moRALDH1 QCCIAASRIF VEESIYDEFV RRSVERAKKY ILGNPLTPGA TQGPQIDKEQ 350
hALDH1      -----V-----
rRALDH1     ---V-----V-----K-----V-----Q-I N-----
mRALDH1     ---V-----V-----K-----V-----I N-----

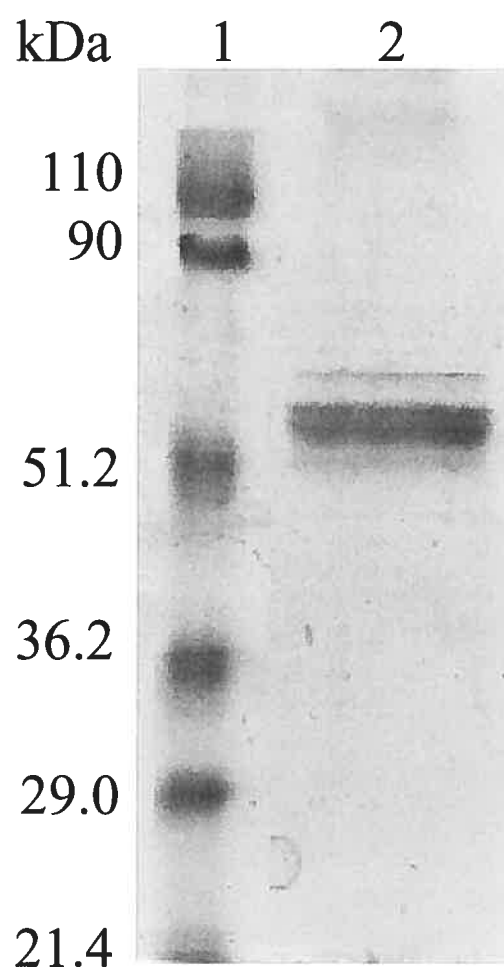
moRALDH1 YDKILD LIES GKKEGAKLEC GGGPWGNKGY FVQPTVFSNV TDEMRIA KEE 400
hALDH1      -----
rRALDH1     H-----R-----F-----
mRALDH1     H-----R-----F-----

moRALDH1 IFGPVQQIMK FKSLDDVIKR ANNTFYGLSA GVFTNDIDKA VTISSALQAG 450
hALDH1      -----K-----I-----
rRALDH1     -----I-----T--A- ---K-L-R- I-V-----
mRALDH1     -----V-----T--A- -L--K-L-- I-V-----

moRALDH1 TVWVN CYGVV TAQCPFGGFK MSGNGRELGE YGFHEYTEVK TVTVKISQKN 500
hALDH1      -----S-----
rRALDH1     V-----MIL S-----H-LY---L- --AM-----
mRALDH1     V-----IML S-----H-LY---L- --AM-----

moRALDH1 S
hALDH1      -
rRALDH1      -
mRALDH1      -

```

Figure 2.5

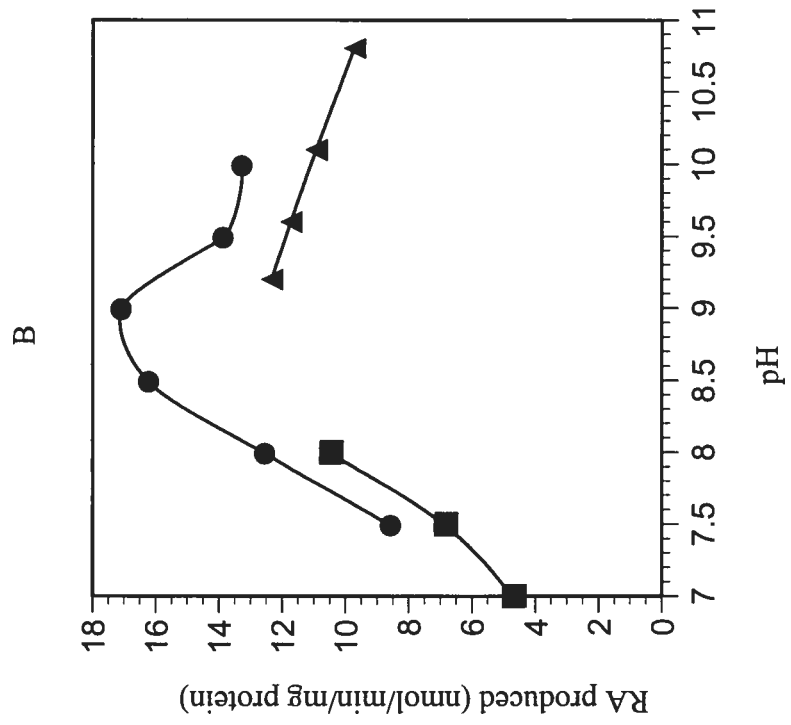
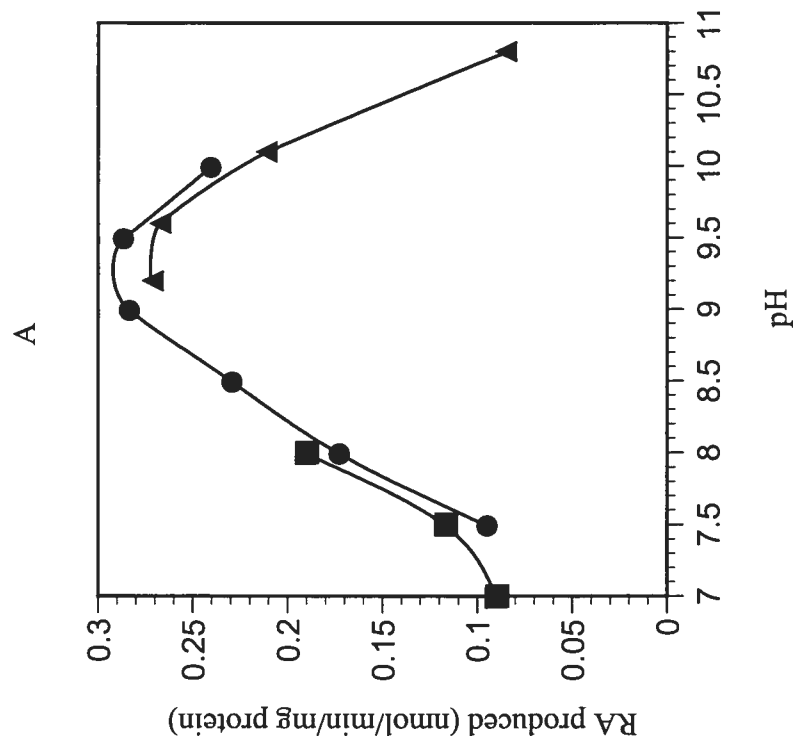


Figure 2.6

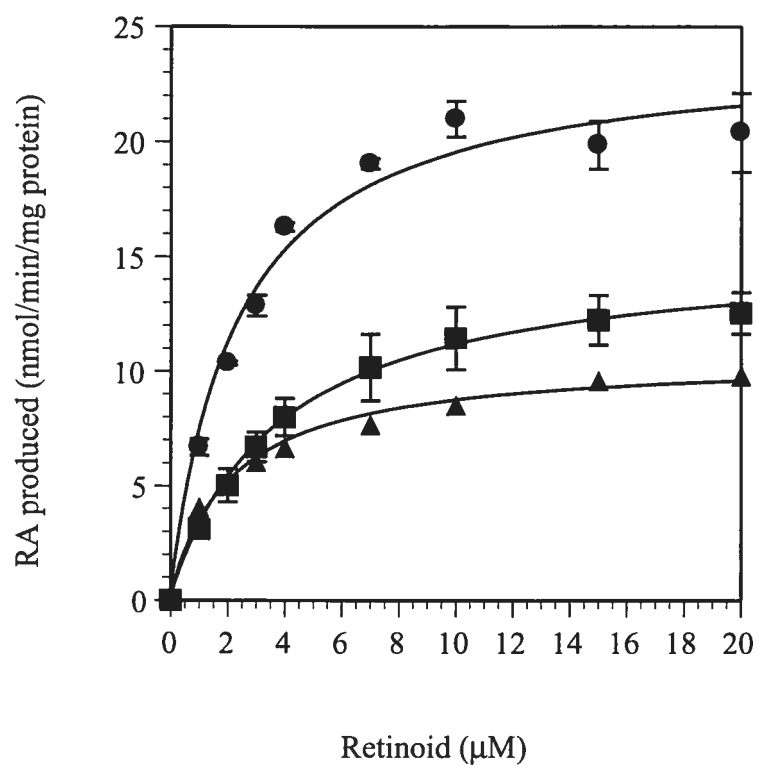
Figure 2.7

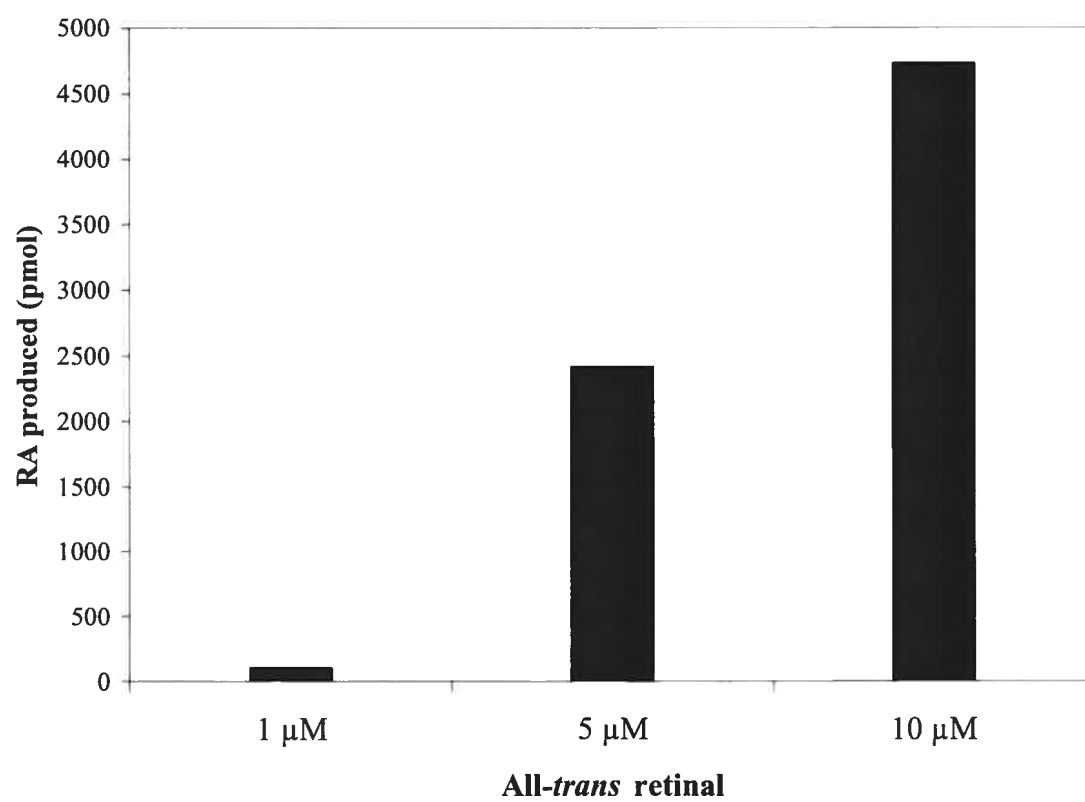
Figure 2.8

Figure 2.9

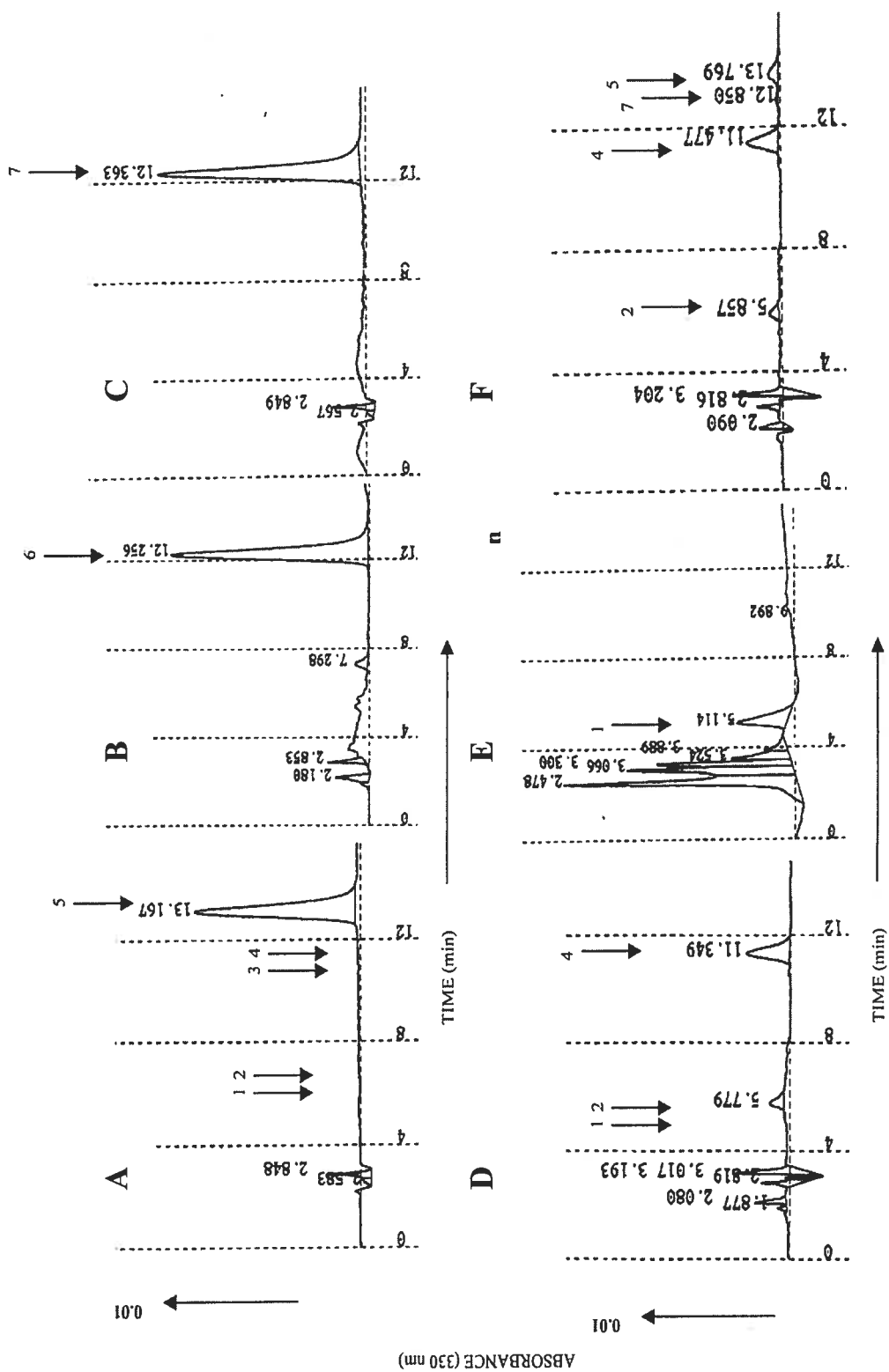
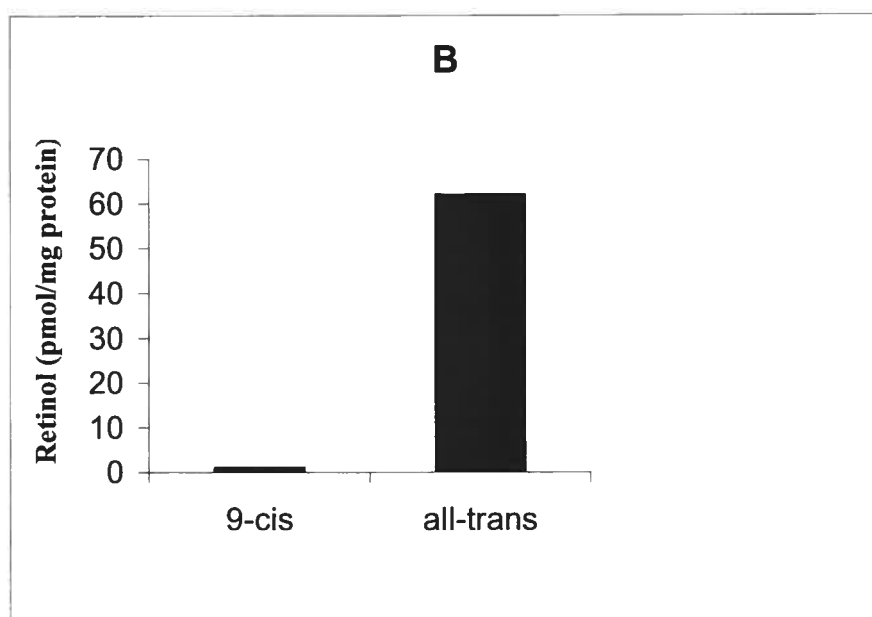
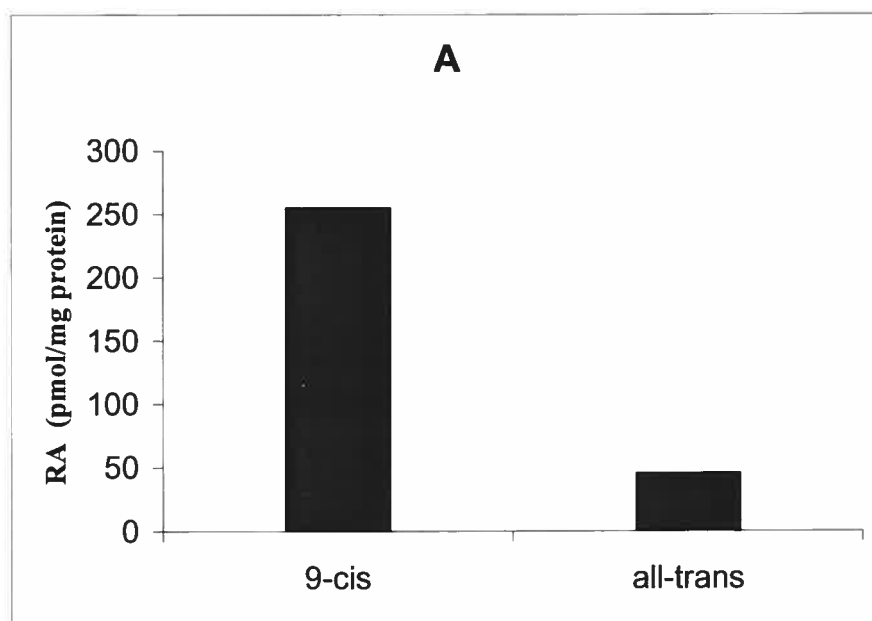


Figure 2.10



CHAPITRE 3

Lorsque nous étudions la RALDH1 de singe, des chimères ayant une spécificité de substrat ont été développés dans le laboratoire. Les études avaient été effectuées sur des enzymes non-purifiées. La spécificité de substrat de ces chimères offrait l'opportunité d'étudier la synthèse d'un seul isomère de rétinoïde à la fois. Nous les avons exprimé dans un système d'expression de mammifère afin de déterminer les propriétés enzymatiques des chimères purifiés et confirmer les résultats obtenus précédemment à partir des lysats totaux. Comme prévu, les enzymes purifiées ont conservé leur spécificité de substrat lors d'études *in vitro*, RALDH-131 catalyse seulement l'oxydation du tout-*trans* RAL tandis que PB-131 oxyde seulement le 9-*cis* RAL.

Article 2

Kinetic properties of chimeric class I aldehyde dehydrogenases for retinal isomers

Hélène Brodeur, Samuel Chagnon, Maxime Parisotto, Sylvie Mader, Pangala V.

Bhat

Accepté dans

Biochemistry and Cell Biology

2006

Kinetic properties of chimeric class I aldehyde dehydrogenases for retinal isomers

Hélène Brodeur^{*}, Samuel Chagnon[§], Maxime Parisotto[§], Sylvie Mader[§] and Pangala V. Bhat^{*†}

Laboratory of Nutrition and Cancer^{*}, Centre Hospitalier de l'Université de Montréal-Hotel Dieu, and the Departments of Biochemistry[§] and Medicine^{*}, Université de Montreal, Montreal, Quebec, Canada

[†]To whom correspondence should be addressed: CHUM Research Centre, Hotel-Dieu, 3850 Saint Urbain St., Montreal, Quebec H2W 1T7, Canada. Tel: 514-890-8000, Ext 12927; Fax: 514-412-7152; E-mail: [REDACTED]

3.1 Abstract

Retinal dehydrogenase type 1 (RALDH1) catalyzes the oxidation of all-*trans* and 9-*cis* retinal to the respective retinoic acids (RAs), whereas another member of the aldehyde dehydrogenase (ALDH) family, the phenobarbital-induced aldehyde dehydrogenase (PB-ALDH), is very poorly active. We have previously generated chimeras between these two enzymes that displayed selectivity for retinal isomers in crude bacterial extracts. Here, we have characterized the kinetic properties of the corresponding purified recombinant proteins. The all-*trans*-selective chimera RALDH-131 converted all-*trans* retinal to all-*trans* RA with 2.9-fold lower efficiency than the wild type RALDH1 and had only residual activity with 9-*cis* retinal. The converse chimera PB-131 was specific for 9-*cis* retinal, with no residual activity for all-*trans* retinal. MgCl_2 inhibited the activities of RALDH1 and PB-131, but not of RALDH-131, suggesting that amino acids 132-510 in RALDH are necessary for inhibition by MgCl_2 . These data demonstrate that the chimeric enzymes act as retinal isomer-selective ALDHs, and suggest that these enzymes may be useful to study the roles of *cis* RA isomers in embryogenesis and differentiation *in vivo*.

Key words: retinal, retinoic acid, aldehyde dehydrogenase, retinal dehydrogenase, recombinant enzymes.

3.2 Introduction

Retinoids are essential for a variety of physiological processes that include vision, reproduction, embryogenesis, cell growth and differentiation (Sari, 1999; Armstrong, et al. 1994; Ross et al. 2000; Rosenthal et al. 1994). They exert their biological functions by binding and activating retinoic acid receptors (RARs) or retinoid X receptors (RXRs) (De Luca, 1991; Chambon, 1995). Two isomers of retinoic acids (RA), *all-trans* and *9-cis* may be important for retinoid signaling. *All-trans* RA binds and activates RARs, and *9-cis* RA binds both RARs and RXRs (Chambon, 1995; Mangelsdorf et al. 1994). RAs are formed *in vivo* by successive oxidation of the precursor retinol (Duester, 1996; Napoli, 2000). Although the enzymatic steps responsible for *all-trans* RA formation from *all-trans* retinol are increasingly well understood, little is known about the formation of *9-cis* RA within cells and tissues.

Enzymes that convert retinal to RA belong to the superfamily of aldehyde dehydrogenases (ALDHs), and are designated as retinal dehydrogenases (RALDHs) (Duester, 2000). We previously characterized the functional properties of RALDH types 1 and 2 and PB-ALDH expressed in bacteria. We found that RALDH1 was highly active for *all-trans* and *9-cis* retinal oxidation, and RALDH2 catalyzed conversion of all 3 retinal isomers (*all-trans*, *9-cis* and *13-cis*) to the respective RAs (Labrecque et al. 1993; 1995; Gagnon et al. 2003; 2002). On the other hand, PB-ALDH was inactive with either *all-trans* or *13-cis* retinal,

and exhibited poor activity for 9-*cis* retinal (Montplaisir et al. 2002; Hsu et al. 1999). In order to examine the amino acid residues responsible for all-*trans* and 9-*cis* retinal oxidation, we generated chimeric enzymes between RALDH1 and PB-ALDH. We demonstrated that amino acid 1-131 in RALDH1 are essential for all-*trans* retinal oxidation, while amino acids 131-343 confer activity for 9-*cis* retinal to the chimeras (Montplaisir et al. 2002).

The purpose of this study was to obtain the kinetic constants of recombinant purified RALDHs for retinal substrates and to characterize the effects of Mg^{++} on the retinal oxidizing activities of these enzymes.

3.3 Materials and Methods

3.3.1 Reagents

All-*trans* and 9-*cis* retinoids were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). The polyclonal antibody raised against rat PB-ALDH (peptide corresponding to residues 5) (Hsu et al. 1999) was kindly supplied by Dr. James Lipsky (Mayo Clinic Foundation, Rochester, MN). The purity of the retinoids was verified by high-pressure liquid chromatography (HPLC) and was found to be greater than 99%. All retinoids were handled in the dark to prevent photoisomerization. HPLC grade solvents were purchased from Fisher Scientific (Toronto, Ontario).

3.3.2 Plasmids

Bacterial expression vectors for His-tagged aldehyde dehydrogenases and chimeras were constructed by excision of the cDNAs of RALDH, PB-ALDH, RALDH-131 and Pb-131 from the pT7.7 parental vectors (Montplaisir et al. 2002) with NdeI and HindIII and subcloning into the same sites in pET28a (Novagen, Madison, WI). Eucaryotic expression vectors for the same enzymes were constructed by PCR amplification of the cDNAs and subcloning at the EcoRI site of pSG5 (Stratagene, La Jolla, CA). Oligonucleotide sequences are available upon request.

3.3.3 Expression in bacteria and enzyme purification

Expression of RALDH, PB-RALDH or chimeras thereof was induced in liquid cultures of BL21 DE3 cells (Novagen, Madison, WI) transformed with the appropriate pET28a expression vector by IPTG 0.1 mM for 2 hours at 37°C and whole bacterial extracts were prepared by sonication in sonication buffer (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 10 mM imidazole and protease inhibitors). Purification of the His-tagged proteins was achieved by passage of the whole bacterial extracts over a Nickel-NTA column (Qiagen, Mississauga, Ontario). Bound proteins were washed with 16 column volumes of washing buffer (sonication buffer containing 20 mM imidazole) and eluted in elution buffer (sonication buffer containing 250 mM imidazole). Purity was assessed by Coomassie staining of purified extracts

separated by SDS-PAGE (12% gel) and densitometric scanning of the gel. The purity of the preparations varied between 76-97%.

3.3.4 Assays of purified enzymes

The activity of purified wild type and chimeric ALDHs for retinal substrates was assayed by measuring RA formation under HPLC, as described previously (Montplaisir et al. 2002). The standard incubation mixture contained 0.02% Tween-80, 161 mM dithiothreitol (DTT) and 603 μ M NAD in 100 mM phosphate buffer (pH 7.5) in a final volume of 250 μ L. The substrates were added to the incubation mixture in 2.5 μ L DMSO. The reaction was performed at 25°C for 1 h to minimize isomerization of the substrates and products. The reaction products were extracted with 400 μ L of butanol:acetonitrile, and analyzed by HPLC. The kinetic constants of the purified enzymes for retinal substrates were obtained by charting saturation curves under conditions in which enzyme activity was linear with respect to protein concentration and reaction time, and by fitting data from the saturation curves to Michaelis-Menten and Lineweaver-Burk plots with the Prism software program (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA). The percentage purity of the enzyme preparations were taken into account when calculating the kinetic constants.

3.3.5 HPLC analysis of enzymatic products

Reversed phase HPLC was performed with a Shimadzu LC-10ADVP system equipped with a SIL-HTC autosampler and cooling system. Retinoids were separated on a Phenomenex 10-ODS analytical column (250 X 4.5 mm, Phenomenex Inc. Torrance CA), and eluted with a mobile phase of acetonitrile:water (60:40) containing 10 mM ammonium acetate, at a flow rate of 1.2 ml/min. Retinoids were detected in a photodiode array detector (Shimadzu Model SPD-M10 AVP) which collected spectra between 200 and 500 nm. Calibration curves for RA were obtained using standard pure solutions of RA. Characteristic UV spectra and retention times identified each RA isomer, and peak areas were measured at $\lambda_{\text{max-330}}$ in a Shimadzu SZ-228 data system. The detection limit for all-*trans* and 9-*cis* RA was 2 pg.

3.4 Results and discussion

3.4.1 Kinetic properties of recombinant ALDHs

We have previously generated chimeras of rat RALDH1 and PB-ALDH (Figure 1) which function as isomer-selective RALDHs in crude bacterial extracts. To characterize the kinetic properties of the purified enzymes, we subcloned the cDNAs for the corresponding enzymes into the pET28a bacterial vector. The resulting expression vectors direct the synthesis of His-tagged ALDHs whose

migration on an SDS-polyacrylamide gel is consistent with the expected molecular mass of 55 kDa (Figure 2). Passage of the crude bacterial extracts over a Nickel-NTA column led to preparations highly enriched in recombinant proteins (Figure 2). The kinetic properties of wild type and chimeric ALDHs with retinal substrates were tested using these purified extracts. RALDH1 oxidized all-*trans* and 9-*cis* retinal to the respective RA (Figure 3A) whereas PB-ALDH exhibited poor activity for 9-*cis* retinal and did not catalyze all-*trans* retinal oxidation (Figure 3B, note the difference in scales). The RALDH-131 chimera retained its activity for all-*trans* retinal, and only residual activity was seen for 9-*cis* retinal compared to the wild type enzyme, which was more active with 9-*cis* than all-*trans* RA (Figure 3C). On the other hand, chimera PB-131 showed activity only for 9-*cis* retinal (Figure 3D). These results confirm our earlier observation of the selectivity of these recombinant ALDHs for retinal substrates in crude bacterial extracts (Montplaisir et al. 2002). The kinetic constants of recombinant ALDHs derived from the substrate saturation curves are reported in Table 1. All-*trans* retinal-specific RALDH-131 had a K_m similar to that of wild type RALDH1 for all-*trans* retinal. However, there was a 2.9-fold difference in catalytic efficiency (V_{max}/K_m) between RALDH-131 and wild type RALDH1 (Table 1), suggesting that replacing amino acid 132-501 of RALDH1 by those in PB-ALDH (RALDH-131) affected slightly the kinetic behavior for all-*trans* retinal. The chimera PB-131, which is specific for 9-*cis* retinal, also exhibited a K_m similar to that of wild type RALDH1 (Table 1). However, the catalytic efficiency of PB-131 for 9-*cis* retinal was 4.8-fold lower than that of wild type RALDH1.

Magnesium has been demonstrated to inhibit cytosolic class I ALDH activity and activate mitochondrial class 2 ALDH activity (Dickinson et al. 1982; Bennett et al. 1983). Magnesium is believed to affect NADH release, which may influence the activities of class I ALDHs (Dickinson et al. 1982, Ho et al. 2005), but its mechanisms of action are not fully understood. To map the residues involved in inhibition by MgCl_2 , we investigated its effects on the activities of wild type and chimeric class I ALDHs for all-*trans* and 9-*cis* retinal oxidation. MgCl_2 inhibited RALDH1 activity for both all-*trans* and 9-*cis* retinal oxidation (Figure 4A). Suppression was biphasic, becoming more pronounced at MgCl_2 concentrations ≥ 2 mM. Inhibition of RALDH1 activity by MgCl_2 has also been observed by Kathmann et al., who used propanal substrate in their incubations (Kathmann et al. 2000). Interestingly, MgCl_2 did not significantly affect the activity of all-*trans* retinal-specific RALDH-131 (Figure 4B), suggesting that replacing amino acids 132-501 in RALDH1 by those in PB-ALDH abolished the inhibitory action of MgCl_2 . On the other hand, MgCl_2 reduced the activity of PB-131 with 9-*cis* retinal in a biphasic manner similar to wild type RALDH1. (Figure 4C). These observations suggest that amino acids 132-501 in RALDH1, which contain residues that bind NAD (aa 159-270) [Dickinson et al. 1982]), are involved in inhibition by MgCl_2 .

In our previous studies we characterized the recombinant enzymes from crude bacterial extracts (Montplaisir et al. 2002). To obtain accurate kinetic constants, we purified these enzymes and determined their kinetic properties. Overall the

kinetic properties of the chimeric ALDHs for retinal isomer substrates were similar to those of wild type RALDH1 indicating that interchanging these peptide regions between RALDH1 and PB-ALDH did not significantly affect the activities for retinal isomer substrates. Thus, the retinal isomer-selective ALDHs characterized in this study should be useful in elucidating the metabolic pathways of *cis* isomer synthesis *in vivo* and in determining their roles in embryogenesis and differentiation. This could be achieved by the creation of transgenic mice expressing retinal isomer-specific ALDHs under the control of the promoter of RALDH2, which is essential for the production of RA required in embryogenesis (Niedereither et al. 1999)

3.5 Acknowledgements

This work was supported by the Canadian Institutes of Health Research (CIHR grant MOP-62926).

3.6 References

Armstrong, R. B., Ashenfelter, K.O Eckhoff, C Levin, A.A and Shapiro, S.S. 1994. In *The Retinoids: Biology, Chemistry, and Medicine*. M. B. Sporn, A. B. Roberts, and D. S. Goodman, editors. Raven Press Ltd, New York, 545-572.

Bennett, A. F., Buckley, P.D and Blackwell, L.F. 1983. Inhibition of the dehydrogenase activity of sheep liver cytoplasmic aldehyde dehydrogenase by magnesium ions, *Biochemistry* 22: 776-784.

Chambon, P. 1996. A decade of molecular biology of retinoic acid receptors. *FASEB J.* 10: 940-954.

De Luca L. M. 1991. Retinoids and their receptors in differentiation, embryogenesis, and neoplasia. *FASEB J.* 5: 2923-2933.

Dickinson, F. M and Hart, G. J 1982. Effects of Mg^{2+} , Ca^{2+} and Mn^{2+} on sheep liver cytoplasmic aldehyde dehydrogenase, *Biochem. J.* 205: 443-448.

Duester, G. 1996. Involvement of alcohol dehydrogenase, short chain dehydrogenase/reductase, aldehyde dehydrogenase, and cytochrome P450 in the control of retinoid signaling by activation of retinoic acid synthesis. *Biochemistry.* 24: 12221-7.

Duester, G. 2000. Families of retinoid dehydrogenases regulating vitamin A function: production of visual pigment and retinoic acid. *Eur. J. Biochem.* 267: 4315-4324.

Gagnon, I., Duester, G., and Bhat, P. V. 2003. Enzymatic characterization of recombinant mouse retinal dehydrogenase type 1. *Biochem. Pharmacol.* 65: 1685-1690.

Gagnon, I., Duester, G., and Bhat, P. V. 2002. Kinetic analysis of mouse retinal dehydrogenase type-2 (RALDH2) for retinal substrates. *Biochim. Biophys. Acta.* 1506: 156-162.

Ho, K. K., Allali-Hassani, A., Hurley, T. D., and Weiner, H. 2005. Differential effects of Mg^{2+} ions on the individual kinetic steps of human cytosolic and mitochondrial aldehyde dehydrogenases. *Biochemistry* 44: 8022-8029.

Hsu, L. C., Chang, W-C, Hoffmann, I and Duester, G. 1999. Molecular analysis of two closely related mouse aldehyde dehydrogenase genes: identification of a role for Aldh1, but not Aldh-pb, in the biosynthesis of retinoic acid. *Biochem. J.* 15:387-95.

Kathmann, E. C., Naylor, S., and Lipsky, J. J.. 2000. Rat liver constitutive and phenobarbital-induced cytosolic aldehyde dehydrogenases are highly homologous proteins that function as distinct isozymes. *Biochemistry.* 39: 11170-11176.

Labrecque, J., Bhat, P. V. and Lacroix, A. 1993. Purification and partial characterization of a rat kidney aldehyde dehydrogenase that oxidizes retinal to retinoic acid. *Biochem. Cell. Biol.* 71: 85-89.

Labrecque, J., Dumas, F., Lacroix, A., and Bhat, P. V. 1995. A novel isozyme of aldehyde dehydrogenase specifically involved in the biosynthesis of 9-cis and all-trans retinoic acid. *Biochem. J.* 305: 681-684.

Mangelsdorf, D., Umesono, J. K., and Evans, R. M. 1994. The retinoid receptors. In *The Retinoids: Biology, Chemistry, and Medicine*. M. B. Sporn, A. B. Roberts, and D. S. Goodman, editors. Raven Press Ltd, New York, 319-349.

Montplaisir, V., Chow Lan, N., Guimond, J., Savineau, C., Bhat, P. V., and Mader, S. 2002. Recombinant class I aldehyde dehydrogenases specific for all-trans or 9-cis retinal. *J. Biol. Chem.* 277: 17486-17492.

Napoli, J. L. Retinoic acid: its biosynthesis and metabolism. 2000. *Prog. Nucleic Acid Res.* 63: 139-188.

Niedereither, K., Subbarayan, V., Dolle, P., and Chambon, P. 1999. Embryonic retinoic acid synthesis is essential for early mouse post-implantation development. *Nature Genetics*, 21:444-448.

Rosenthal, D., Lancillotti, F., Darwiche, N., Sinha, R., and De Luca, L. M.. 1994. Regulation of epithelial differentiation by retinoids. In *Regulation of Epithelial Differentiation by Retinoids*. R. Blomhoff editor. M. Decker, New York, pp. 425-450.

Ross, S. A., McCaffery, P. J., Drager, U. C., and De Luca, L. M. 2000. Retinoids in embryonal development. *Physiol. Rev.* 80: 1021-1054.

Saari, J. C. 1999. Retinoids in mammalian vision. In *The Retinoid in Mammalian Vision*: H. Nau, W. S. Blaner, editors. Springer, Heidelberg, pp. 563-610.

3.7 Figure Legends

Figure 3.1. Construction of chimeras between RALDH1 and PB-ALDH.

Chimeras of RALDH-131 and PB-131 were constructed by exchange of restriction fragments between RALDH1 and PB-ALDH as described previously [ref. 15]

Figure 3.2. Purification of recombinant ALDHs.

Protein samples prepared from BL21 DE3 bacteria expressing RALDH1, PB-ALDH, or the chimeric derivatives RALDH-131 or PB-131 were purified over a Ni-NTA affinity column and aliquots of eluted fractions (20 µg) were separated by SDS-PAGE (12 % gel) and stained with Coomassie blue reagent as described in Materials and Methods.

Figure 3.3. Catalysis of RA formation from all-trans (○) retinal and 9-cis (●) by purified recombinant ALDHs. Increasing concentrations of purified RALDH1 (A), PB-ALDH (B), or the chimeric derivatives RALDH-131 (C) or PB-131 (D) were incubated with 10 μ M of 9-*cis* (closed circle) or all-*trans* (open circle) retinal isomers at 25°C for 1 h. Each point in the curve represents the average of triplicate values (variation between replicates is less than 10%). Note the different scales used for RA production, particularly in the case of PB-ALDH (panel B)

Figure 3.4. Effects of MgCl₂ on the all-*trans* (○) and 9-*cis* (●) retinal oxidation activities of ALDHs. The assay consisted of 0.8-2 μ g of ALDH protein with 10 μ M substrates under standard incubation conditions, with final concentrations of MgCl₂ varying between 0-4 mM. The points are the average of triplicate experiments (less than 12% variation between replicates). A: Wild type RALDH (0.8 μ g); B: RALDH-131 (2 μ g); and C: PB-131 (1.5 μ g).

Figure 3.1

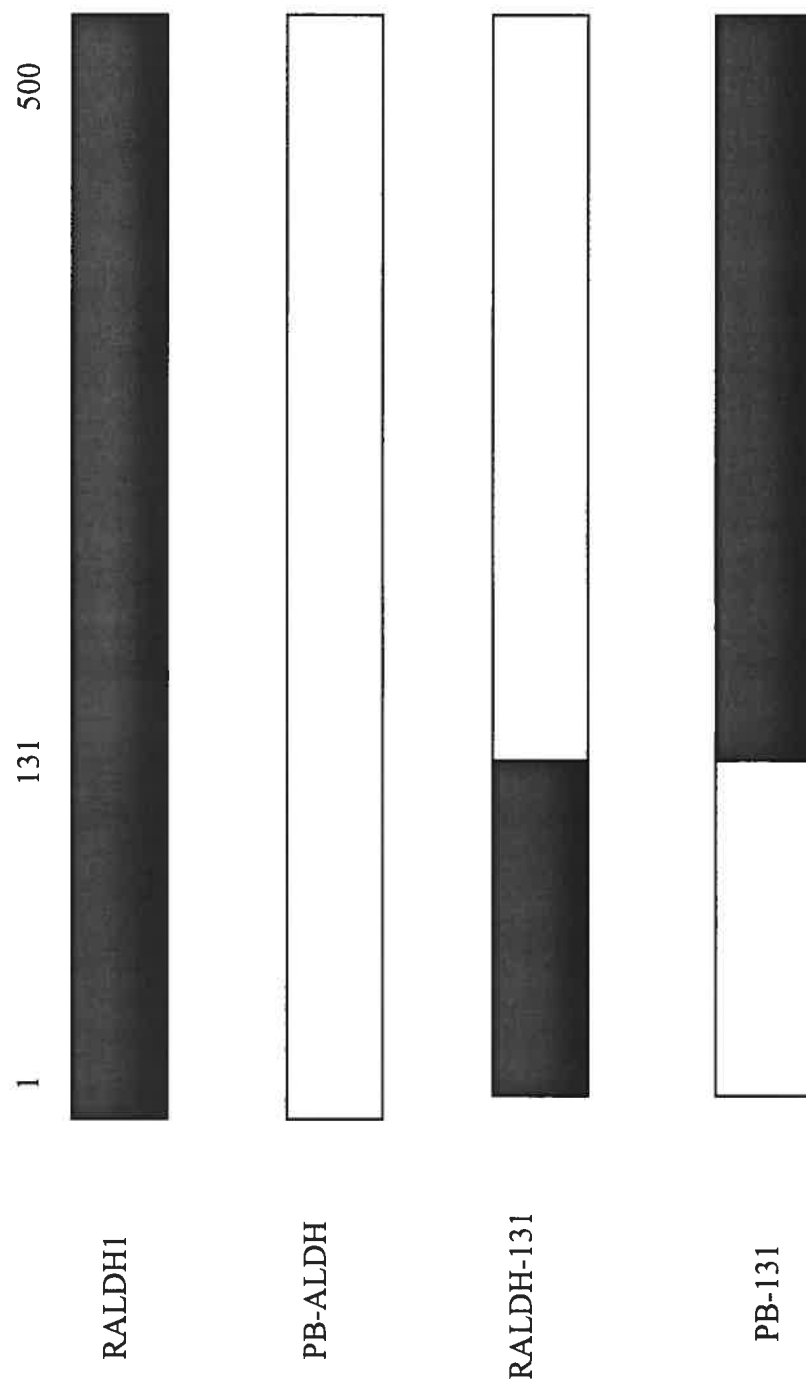
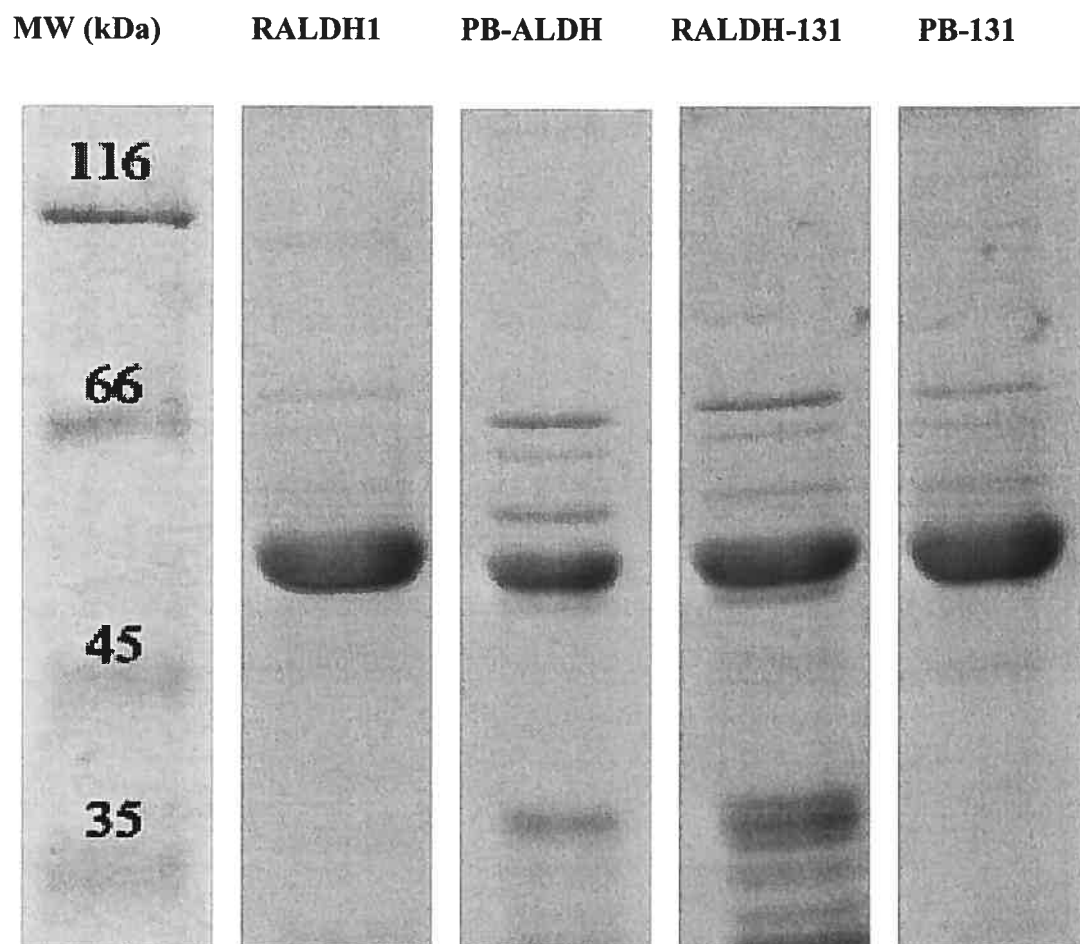


Figure 3.2



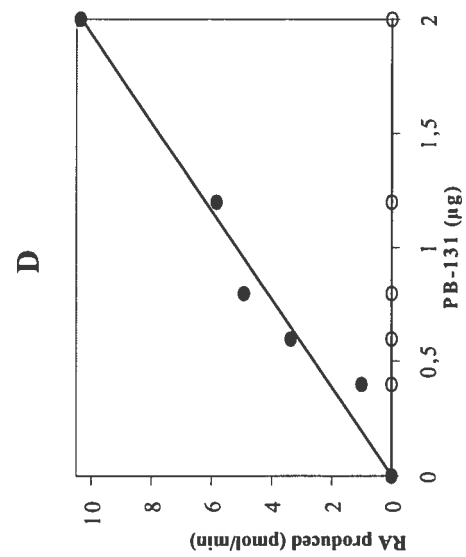
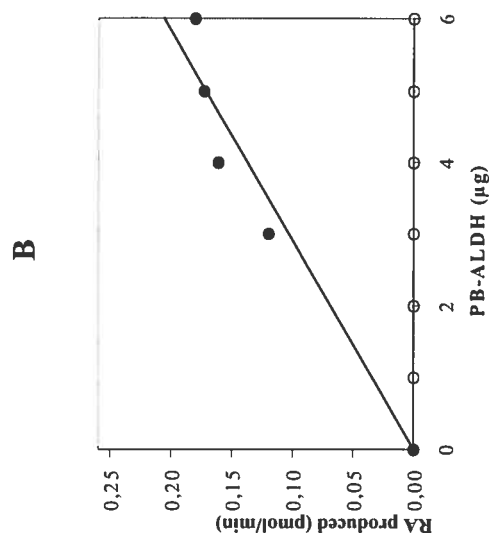
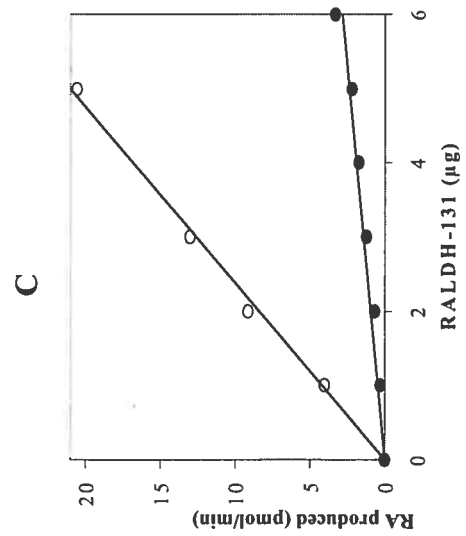
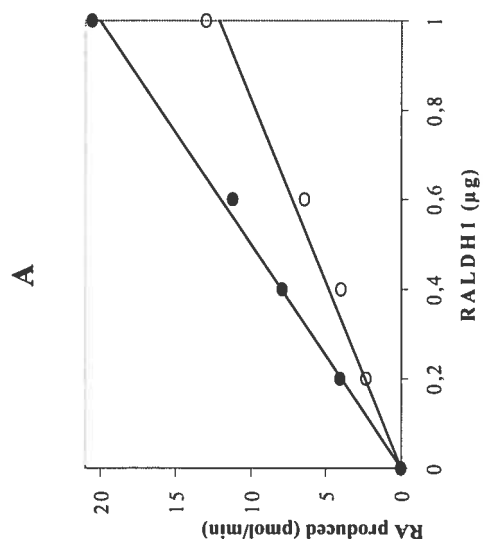


Figure 3.3

Figure 3.4

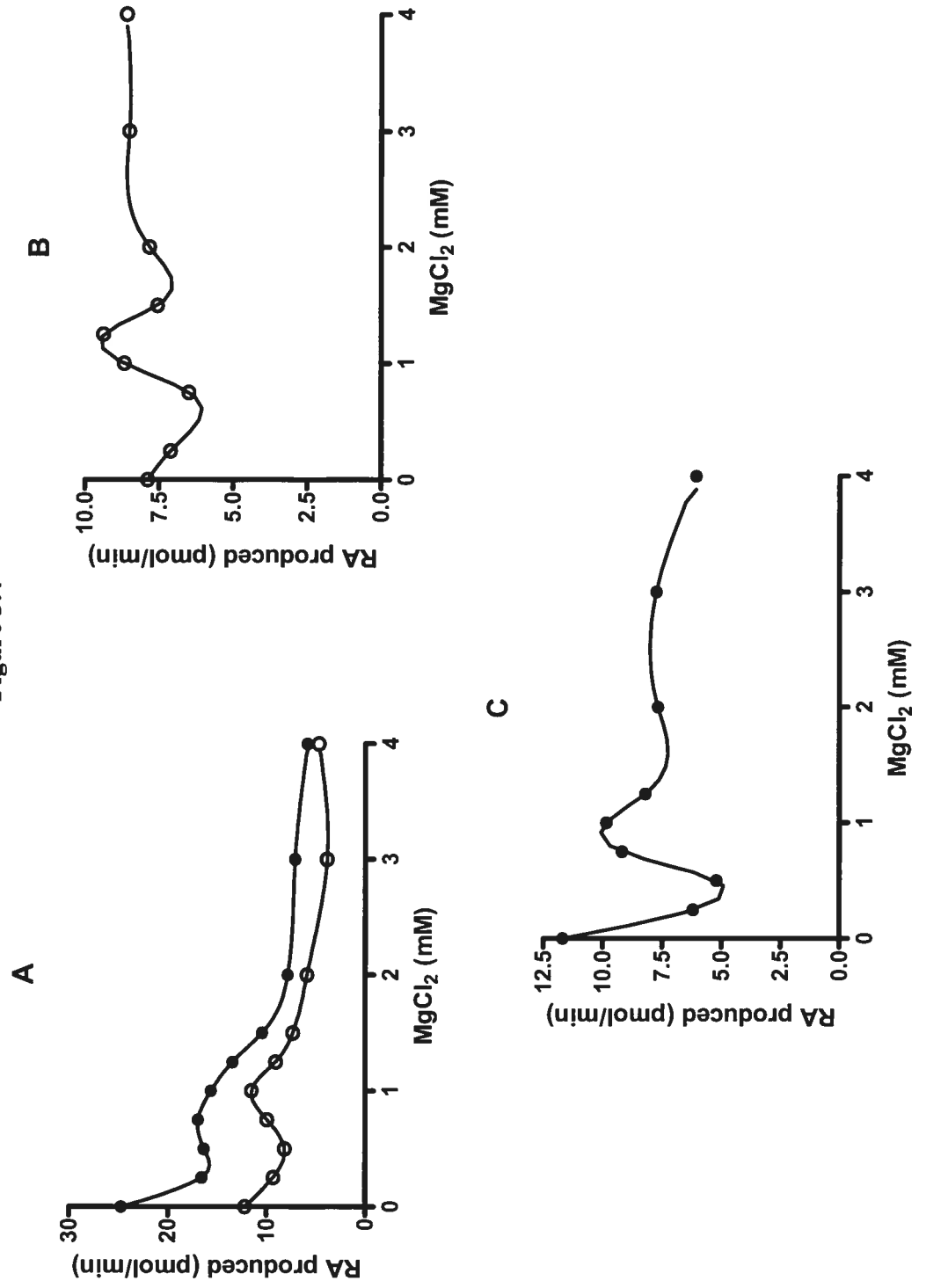


Table I

	Km		Vmax		Vmax/Km	
	All- <i>trans</i>	9- <i>cis</i>	All- <i>trans</i>	9- <i>cis</i>	All- <i>trans</i>	9- <i>cis</i>
	μM		nmol/min/mg			
RALDH1	10.7	7.7	18.63	33.36	1.74	4.33
RALDH-131	8.5	ND ^a	5.2	ND	0.61	ND
PB-131	ND	9.7	ND	8.8	ND	0.91

^aND, not determined

The kinetic parameters were obtained from saturation curves performed twice in triplicate.

CHAPITRE 4

Nous croyons que la spécificité de substrat des chimères RALDH-131 et PB-131 observée *in vitro*, à partir de lysats totaux ou d'enzymes purifiées, serait conservée en milieu cellulaire. Nous avons donc exprimé, de manière transitoire, les chimères et les enzymes sauvages dans des cellules n'ayant aucune activité endogène rétinaldéhyde déshydrogénase. Ces études nous ont permis de démontrer qu'il n'y avait aucune isomérisation du substrat RAL ou du produit AR (produit ou libre) dans un milieu cellulaire exprimant de manière transitoire des enzymes spécifiques pour un substrat. Ces résultats laissent présager que les chimères se comporteront de manière spécifique *in vivo*, ce qui en font d'excellents outils pour étudier le métabolisme des isoformes tout-*trans* et 9-*cis* de l'AR ainsi que leur rôle dans l'organisme.

Article 3

**Isomer-specific retinoic acid biosynthesis in HeLa cells expressing recombinant
class I aldehyde dehydrogenases**

Hélène Brodeur, Samuel Chagnon, Maxime Parisotto, Sylvie Mader and Pangala

V. Bhat

En préparation

**Isomer-specific retinoic acid biosynthesis in HeLa cells expressing
recombinant class I aldehyde dehydrogenases**

Hélène Brodeur^{*}, Samuel Chagnon[§], Maxime Parisotto[§], Sylvie Mader^{§¶} and
Pangala V. Bhat^{*†}

Laboratory of Nutrition and Cancer^{*}, Centre Hospitalier de l'Université de
Montréal-Hotel Dieu, and the Departments of Biochemistry[§] and Medicine^{*},
Université de Montreal, Montreal, Quebec, Canada

[†]To whom correspondence should be addressed: CHUM Research Centre, Hotel-
Dieu, 3850 Saint Urbain St., Montreal, Quebec H2W 1T7, Canada. Tel: 514-890-
8000, Ext 12927; Fax: 514-412-7152; E-mail: [REDACTED]

[¶]To whom correspondence should be addressed: Dept. of Biochemistry, Faculty
of Medicine, Université de Montréal, CP 6128 Succursale Centre-Ville,
Montreal, Quebec, H3C 3J7, Canada. Tel: 514-343-6111, Ext 5173; Fax 514-
343-2210; E-mail: [REDACTED]

4.1 Abstract

Retinal dehydrogenase type 1 (RALDH1) catalyzes the oxidation of all-*trans* and 9-*cis* retinal to the respective retinoic acids (RAs), whereas another member of the aldehyde dehydrogenase family, the phenobarbital-induced aldehyde dehydrogenase (PB-ALDH), is very poorly active. We have previously generated chimeras between these two enzymes that displayed selectivity for retinal isomers in crude bacterial extracts. To examine whether the selectivity of the recombinant enzymes is retained *in vivo*, we first assessed whether retinoid-isomerizing activity is present in cultured eukaryotic cells. Our results demonstrate that the only RA isomers detected in RALDH1-expressing or non-expressing cells corresponded to the same steric conformation as the supplied retinoids, indicating a lack of measurable 9-*cis*/all-*trans* retinoid-isomerizing activity. Finally, HeLa cells transfected with RALDH1 derivatives that were retinal isomer-selective *in vitro* produced only the corresponding isomers of RA *in vivo*, establishing these enzymes as useful tools to assess the respective roles of the two RA isomers *in vivo*.

Key words: retinal, retinoic acid, aldehyde dehydrogenase, retinal dehydrogenase, recombinant enzymes, retinoid metabolism.

4.2 Introduction

Retinoids play important role in a variety of physiological processes that include vision, reproduction, embryogenesis, cell growth and differentiation [1-4]. They exert their biological activities by binding and activating retinoic acid receptors (RARs) or retinoid X receptors (RXRs) [5,6]. Two isomers of retinoic acids (RA), *all-trans* and *9-cis* may be important for retinoid signaling. *All-trans* RA binds and activates RARs, and *9-cis* RA binds both RARs and RXRs [6,7]. RAs are formed *in vivo* by successive oxidation of the precursor retinol [8,9]. Although the enzymatic steps responsible for *all-trans* RA formation from *all-trans* retinol are increasingly well understood, little is known about the formation of *9-cis* RA within cells and tissues. *In vivo*, *9-cis* RA can be formed via 3 possible metabolic pathways. These pathways include (i) sequential enzymatic oxidation of *9-cis* retinol to *9-cis* RA, a pathway similar to the oxidation of *all-trans* retinol to *all-trans* RA [10-14], (ii) the oxidation of *9-cis* retinal generated by the cleavage of *9-cis* β -carotene [15], and (iii) the isomerization of *all-trans* RA to *9-cis* RA likely by non-enzymatic mechanisms [16]. Although several *in vitro* studies have convincingly demonstrated the formation of *9-cis* RA through these metabolic pathways, it is still unclear whether and how *9-cis* RA is produced *in vivo*. Furthermore, the physiological significance of *9-cis* RA in RA signaling *in vivo* has not been demonstrated unequivocally.

Enzymes that oxidizes retinal to RA belong to the superfamily of aldehyde dehydrogenases (ALDHs), and are designated as retinal dehydrogenases (RALDHs) [17]. We previously characterized the kinetic properties of RALDH types 1 and 2 and PB-ALDH expressed in bacteria. We found that RALDH1 was highly active for all-*trans* and 9-*cis* retinal oxidation, and RALDH2 catalyzed conversion of all 3 retinal isomers (all-*trans*, 9-*cis* and 13-*cis*) to the respective RAs [11, 18, 19]. On the other hand, PB-ALDH was inactive with either all-*trans* or 13-*cis* retinal, and exhibited poor activity for 9-*cis* retinal [20, 21]. We generated chimeric enzymes between RALDH1 and PB-ALDH and demonstrated that amino acid 1-131 in RALDH1 are essential for all-*trans* retinal oxidation, while amino acids 131-343 confer activity for 9-*cis* retinal to the chimeras [20]. In this report, we demonstrate that the isomer-selective chimeras lead to the synthesis of either all-*trans* or 9-*cis* RA without detectable isomerization in transiently expressing cells.

4.3 Materials and Methods

4.3.1 Reagents

All-*trans* and 9-*cis* retinoids were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). The polyclonal antibody raised against rat PB-ALDH [peptide corresponding to residues 5-16] was kindly supplied by Dr. James Lipsky (Mayo Clinic Foundation, Rochester, MN). The polyclonal antibody to human RALDH1

was a generous gift from Dr. L. Sreerama (St-Cloud University, Minnesota). The purity of the retinoids was verified by reverse phase high-pressure liquid chromatography (HPLC) and was found to be greater than 99%. All retinoids were handled in the dark to prevent photoisomerization. HPLC grade solvents were purchased from Fisher Scientific (Toronto, Ontario).

4.3.2 Plasmids

Eucaryotic expression vectors for aldehyde dehydrogenases and chimeras were constructed by PCR amplification of the cDNAs of RALDH, PB-ALDH, RALDH-131 and Pb-131 from the pT7.7 parental vectors [20], and subcloning at the EcoRI site of pSG5 (Stratagene, La Jolla, CA). Oligonucleotide sequences are available upon request. Figure 1 shows wild type and chimeric ALDHs and their demonstrated *in vitro* activities towards retinal isomer substrates [20].

4.3.3 Enzyme assay

The RALDH activity in cell lysates obtained from HeLa transfected with recombinant ALDHs and from cells constitutively expressing RALDHs (HepG2, JTC12) was assayed by measuring RA formation under HPLC, as described previously [20]. The standard incubation mixture contained 0.02% Tween-80, 161 mM dithiothreitol (DTT) and 603 μ M NAD in 100 mM phosphate buffer (pH 7.5) in a final volume of 250 μ L. The substrates were added to the incubation

mixture in 2.5 μ L DMSO. The reaction was performed at 25°C for 1 h to minimize isomerization of the substrates and products. The reaction products were extracted with 400 μ L of butanol:acetonitrile, and analyzed by HPLC .

4.3.4 Cell culture, transient transfections and metabolic assays

HeLa (human cervicalcarcinoma), HepG2 (human hepatoma) and JTC12 (monkey kidney proximal tubule) cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (Invitrogen, Burlington, Ontario), supplemented with 10% fetal bovine serum, high glucose and the antibiotics pencillin (100 units/ml) and streptomycin (100 μ g/ml) at 37°C under 5% CO₂.

HeLa cells were transfected with pSG5 constructs containing recombinant wild type or chimeric ALDHs, using calcium phosphate precipitation according to Jordan et al. [22]. Plasmid DNA (5 μ g) was co-transfected with 2 μ g of CMV- β -gal to normalize transfection. The cells were transfected for 48 h and incubated either with 10 μ M retinal isomers or 1 μ M RA isomers for 3 h. After incubation, they were washed with cold phosphate-buffered saline, scraped and collected by centrifugation. Retinoids were extracted from cell pellets with 400 μ L acetonitrile:butanol (1:1), and analyzed by HPLC.

Metabolic assays in HepG2 and JTC12 cells were carried out at 70% confluency by incubation with 1 μ M RA for 3 h, and retinoids were extracted for analysis as described above.

4.3.5 HPLC analysis of RA metabolism

Reversed phase HPLC was performed with a Shimadzu LC-10ADVP system equipped with a SIL-HTC autosampler and cooling system. Retinoids were separated on a Phenomenex 10-ODS analytical column (250 X 4.5 mm, Phenomenex Inc. Torrance CA), and eluted with a mobile phase of acetonitrile:water (60:40) containing 10 mM ammonium acetate, at a flow rate of 1.2 ml/min. Retinoids were detected in a photodiode array detector (Shimadzu Model SPD-M10 AVP) which collected spectra between 200 and 500 nm. Calibration curves for RA were obtained using standard pure solutions of RA. Characteristic UV spectra and retention times identified each RA isomer, and peak areas were measured at $\lambda_{\text{max-330}}$ in a Shimadzu SZ-228 data system. The detection limit for all-*trans* and 9-*cis* RA was 2 pg.

4.3.6 Western blotting

Harvested cells were lysed in TEN buffer pH 7.4 (2 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 0.1 M NaCl, 0.1% NP-40, 1 mM DTT, and 1 mM PMSF), cell debris were eliminated by centrifugation at 13,000 rpm, and the supernatant was boiled in 2x loading buffer. Proteins were separated by 10% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and transferred to a Hybond-C nitrocellulose membrane (Amersham, Baie d'Urfé, Québec). The membrane was blocked with 5% milk at room temperature before incubation with the appropriate

antibody. Immunoreactive proteins were detected in an ECL Western blotting system.

4.4 Results

4.4.1 Lack of isomerization of retinoic acid isomers in RALDH1-expressing or non-expressing cells

With the ultimate goal of testing whether isomer-selective ALDHs can be used to specifically produce all-*trans* or 9-*cis* RA *in vivo*, we first questioned whether RA isomers taken up by cells in culture retain their configuration. To exclude a possible role of RALDH1 itself in uptake and/or conversion of RA, we used two cells lines, JTC12 and HepG2, which express this enzyme, as well as HeLa cells, which do not.

The purity of RA isomers used in the study was verified by HPLC (Figure 2). The HPLC profile (Figure 2A and 2C) and UV spectra (Figure 2B and 2D) of standard all-*trans* and 9-*cis* RA showed that these compounds were more than 99% pure. After incubation of HeLa cells with all-*trans* RA for three hours in the dark, retinoids were extracted and analyzed by HPLC to assess for potential *in vivo* isomerization. The HPLC profile of retinoids extracted from the cells revealed the presence of only all-*trans* RA (Figure 3A). The peak eluting at 5.1 min was confirmed as all-*trans* RA by its characteristic UV spectrum (Figure

3B). Similarly, incubation of cells with 9-*cis* RA resulted in the accumulation of only 9-*cis* RA (Figure 3C and 3D). Further, isomerization of all-*trans* or 9-*cis* RA was not observed in HeLa cells transiently expressing RALDH1, PB-ALDH, RALDH-131 or PB-131 (Figure 4A-B and HPLC data not shown). In addition, uptake of 9-*cis* RA was ~5-fold lower than that of all-*trans*, again irrespective of ALDHs expression or not. Lower uptake of 9-*cis* RA compared to all-*trans* RA has also been shown by other investigators in HL-60 cells [23]. These data indicate that RA isomer uptake and isomerization are not affected by the presence or absence of ALDHs in cells.

The uptake and metabolism of RA isomers were also investigated in JTC12 and HepG2 cells endogenously expressing RALDH1 [24,25]. RALDH1 expression in JTC12 and HepG2 cells was verified by Western blotting (Figure 5A). RALDH1 expression was further confirmed by *in vitro* enzyme assays (Figure 5B). As expected, RALDH1-containing cell extracts oxidized both all-*trans* and 9-*cis* retinal to their respective RA isomers with higher activity for 9-*cis* retinal (Figure 5B). To determine whether interconversion of RA isomers takes place in these cells, we incubated them with either all-*trans* or 9-*cis* RA. JTC12 and HepG2 cells took up all *trans* and 9-*cis* RA, with a lower uptake of 9-*cis* versus all-*trans* RA in HepG2 cells, but not in JTC12 cells. No interconversion between the two isomers was observed (Figure 5C and 5D), suggesting that RA isomers incorporated by both cell types retain their isomeric configuration.

4.4.2 *In vitro* and *in vivo* metabolism of retinal isomers in HeLa cells transiently expressing ALDHs

To assess whether chimeras RALDH-131 and PB-131 could lead to selective production of all-*trans* and 9-*cis* RA when expressed in eukaryotic cells, we transfected eukaryotic expression vectors for these enzymes and the parental RALDH1 and PB-ALDH enzymes transiently in RALDH-negative HeLa cells. Expression of these ALDHs was verified by Western blotting (Figure 6A). Cell lysates containing these enzymes were then assessed for their capacity to oxidize all-*trans* or 9-*cis* retinal *in vitro* (Figure 6B). Similar to endogenous RALDH1 (11), transiently-expressed recombinant RALDH1 displayed higher activity for 9-*cis* retinal versus all-*trans* retinal oxidation. As expected, transiently expressed wild type PB-ALDH had no activity for all-*trans* retinal and exhibited poor activity for 9-*cis* retinal [20]. Furthermore, the recombinant RALDH-131 and PB-131 expressed in HeLa cells retained their selectivity for all-*trans* or 9-*cis* retinal oxidation, respectively (Figure 6B), suggesting that activity of these enzymes is not altered by eukaryotic cell-specific modifications.

We next investigated the *in vivo* conversion of all-*trans* and 9-*cis* retinal to the respective RA isomers in intact cells expressing recombinant ALDHs. The purity of all-*trans* and 9-*cis* retinal used in incubation was more than 99% as indicated by HPLC analysis (Figure 7A and 7C) and by the UV spectra of compounds eluted from HPLC (Figures 7B and 7D). The HPLC profile of metabolites formed

in cells expressing RALDH1 and RALDH-131 and incubated with all-*trans* retinal demonstrates conversion of all-*trans* retinal to all-*trans* RA without detectable formation of 9-*cis* RA (Figure 8A and 8C). This was confirmed by the UV spectrum of the compound eluting at ~5.1 min (Figure 8B and 8D). In addition, HeLa cells also reduced all-*trans* retinal to all-*trans* retinol (peak at 10 min, Figure 8A and 8C). On the other hand, PB-ALDH and PB-131 did not generate any RA from all-*trans* retinal (data not shown). The metabolites formed in cells expressing RALDH1 and PB-131 incubated with 9-*cis* retinal are depicted in Figure 8E-H. RALDH1 and PB-131 converted 9-*cis* retinal to the corresponding RA without the formation of detectable all-*trans* RA (Figure 8E and 8G). The UV spectrum of the RA isomer eluting at ~4.8 min further confirmed the presence of only 9-*cis* RA (Figure 8F and 8H). PB-ALDH and RALDH-131 expressed in the cells also converted 9-*cis* retinal to 9-*cis* RA without detectable formation of all-*trans* RA (data not shown). The quantities of RA isomers produced from precursor retinal isomers by various wild type and chimeric recombinant ALDHs are shown in Figure 9. It is noteworthy that cells expressing RALDH1 produced levels of all-*trans* RA that were 2 fold higher than levels of 9-*cis* RA in spite of the greater activity of this enzyme with 9-*cis* retinal. This could be due to differences in uptake or metabolism to retinol of the precursors all-*trans* and 9-*cis* retinal by these cells. The chimeric enzymes directed isomer-selective RA synthesis, with no detectable all-*trans* RA synthesized in cells expressing PB-131, and as little 9-*cis* RA produced from cells expressing RALDH-131 as from cells expressing PB-ALDH. In addition, the

amounts of all-*trans* RA produced from all-*trans* retinal by cells expressing RALDH-131 are similar to those of cells expressing wild type RALDH1 (Figure 9A). Similarly, cells expressing PB-131 incubated with 9-*cis* retinal generated amounts of 9-*cis* RA similar to those of wild type RALDH1 (Figure 9B). These observations suggest that RALDH-131 and PB-131 expressed in eukaryotic cells retain their selectivity for all-*trans* or 9-*cis* retinal, respectively, and should generate sufficient quantities of RA to exert retinoid signaling effects.

4.5 Discussion

Our previous studies on the activities of various ALDHs for retinal isomer substrates led to the identification of amino acid regions that are important for 9-*cis* and all-*trans* retinal oxidation [20]. Using chimeras of RALDH1 and retinal-inactive PB-ALDH, we demonstrated that amino acids 1-131 of RALDH1 (RALDH-131) were involved in the oxidation of all-*trans* retinal, whereas amino acids 131-343 (PB-131) conferred activity with 9-*cis* retinal (Figure 1, 20). Here, we demonstrate that isomer specific chimeric ALDHs produce respective RA isomers *in vivo* in transiently expressing HeLa cells and that these cells are devoid of any retinoid isomerase activity.

Several studies have demonstrated that RA can undergo *cis-trans* isomerization when provided to animals or cells in free form [16, 26-30]. However, no isomerases involved in this process have been identified, leading to the

speculation that interconversion of *cis-trans* RA occurs *in vivo* and *in vitro* through non-enzymatic mechanism(s). Although there are numerous reports on the interconversion of all-*trans* and 13-*cis* RA *in vitro* in cell homogenates and *in vivo* in whole animals [26-29], limited information is available on the *cis-trans* isomerization of all-*trans* and 9-*cis* RA *in vitro* and *in vivo*. *In vitro*, the liver membrane converts all-*trans* RA to 9-*cis* and 13-*cis* RA [16]. The *cis-trans* isomerization of RA occurs in hepatocytes in culture but not in endothelial cells, suggesting that the abilities of cells to take up and isomerize RA are diverse and cell-type dependent [31]. In animals, the interconversion of all-*trans* and 9-*cis* RA has been observed when pharmacological doses of these compounds are administered [32].

To test whether RA supplied in free form to cells expressing endogenous or recombinant ALDHs undergo *cis-trans* isomerization, we incubated these cells for 3 h with all-*trans* and 9-*cis* RA. Because all-*trans* and 9-*cis* retinal were relatively stable in the medium for 3 h under our experimental conditions, we choose 3 h incubation time to study cell associated *cis-trans* isomerization. In addition, 3 h incubation minimized the secretion of RA that is made in the cells into the medium. We found that significant amount of retinal taken up by the cells were reduced to retinol (Figure 9) indicating the presence of highly active reductase in the cells. At present we do not know the nature of this enzyme expressed in the cells. *In vitro* assay of RALDH showed higher activity for 9-*cis* retinal compared to all-*trans* retinal (Figure 5 and 6, 11). However, cells

transiently expressing RALDH and incubated with all-*trans* and 9-*cis* retinal showed 2-fold lower levels of 9-*cis* RA compared to all-*trans* RA (Figure 9). This could be due to either lower uptake of 9-*cis* retinal or higher conversion of 9-*cis* retinal into other metabolites such as retinol and retinyl esters by the cells. Since *in vitro* assays of HeLa cell extract and *in vivo* incubation with all-*trans*-retinal did not show any RALDH activity and all-*trans* RA formation respectively, it is unlikely that higher levels of all-*trans* RA observed in the cells incubated with all-*trans* retinal is due to the presence of other yet unidentified retinal oxidizing activity.

In our HPLC analysis all-*trans* and 9-*cis* RA were closely eluted with retention times of ~5.1 and 4.8 min, respectively. However, they can easily be distinguished by their characteristic UV spectra (Figure 3). Scanning the compound eluting at 5.1 and 4.8 min revealed only the presence of all-*trans* and 9-*cis* RA, respectively. While it remains possible that small quantities of *cis* and all-*trans* RA below the limits of detection may be generated, our results indicate the absence of significant *cis-trans* isomerization in HeLa cells under our experimental conditions (Figures 3 and 8). Moreover, transient expression of ALDHs did not influence either the uptake or the metabolism of RA isomers (Figure 4). The lack of RA-isomerizing activity in JTC12 or HepG2 cells constitutively expressing RALDH further supported the notion that RALDHs do not play a role in *cis-trans* isomerization of RA. Together, these observations argue against widespread expression of a cellular *cis-trans* isomerase activity.

The occurrence of 9-*cis* RA and its biological relevance *in vivo* are still unclear [32-38]. The existence of *cis* retinol isomers and enzymes capable of oxidizing these isomers to the respective RAs [11-14, 39, 40] suggests that *cis* RA isomers may form *in vivo* from precursor retinoids. However, the requirements of RA isomers by various organs during development and adulthood are not known. The *in vivo* metabolism of exogenously administered retinoids is complex since it involves absorption, transport and uptake by the tissues, which may differ for the different isomers, as evidenced for instance by the differential uptake of all-*trans* and 9-*cis* RA by HeLa and HL-60 cells [present observation, 23]. Since high doses of exogenously administered *trans* and *cis* RA isomers result in non-enzymatic interconversion in the plasma compartment, it is difficult to prove unequivocally the biological functions of *cis* RA isomers *in vivo*. The retinal isomer-selective ALDHs characterized in this study should help address these issues by achieving selective synthesis of 9-*cis* or all-*trans* RA *in vivo*. The creation of transgenic mice expressing retinal isomer-specific ALDHs under the control of the promoter of RALDH2, which is essential for the production of RA required in embryogenesis [41], should elucidate the metabolic pathways of 9-*cis* RA isomer formation and their role in embryogenesis and differentiation.

4.6 Acknowledgements

This work was supported by the Canadian Institutes of Health Research (CIHR grant MOP-62926).

4.7 References

- [1] J. C. Saari, Retinoids in mammalian vision. In *The Retinoid in Mammalian Vision*: H. Nau, W. S. Blaner, editors. Springer, Heidelberg, 1999, pp. 563-610.
- [2] R. B. Armstrong, K. O. Ashenfelter, C. Eckhoff, A. A. Levin, and S. S. Shapiro, In *The Retinoids: Biology, Chemistry, and Medicine*. M. B. Sporn, A. B. Roberts, and D
- [3] S. A. Ross, P. J. McCaffery, U. C. Drager, and L. M. De Luca, Retinoids in embryonal development. *Physiol. Rev.* 80 (2000) 1021-1054.
- [4] D. F. Rosenthal, Lancillotti, N. Darwiche, R. Sinha, and L. M. De Luca, Regulation of epithelial differentiation by retinoids. In *Regulation of Epithelial Differentiation by Retinoids*. R. Blomhoff editor. M. Decker, New York, 1994 pp. 425-450.
- [5] L. M. De Luca, Retinoids and their receptors in differentiation, embryogenesis, and neoplasia, *FASEB J.* 5 (1991) 2923-2933.
- [6] P. Chambon, A decade of molecular biology of retinoic acid receptors, *FASEB J.* 10 (1996) 940-954.
- [7] D. J. Mangelsdorf, K. Umesono, and R. M. Evans, The retinoid receptors. In *The Retinoids: Biology, Chemistry, and Medicine*. M. B. Sporn, A. B. Roberts, and D. S. Goodman, editors. Raven Press Ltd, New York, 1994 319-349.
- [8] G. Duester, Involvement of alcohol dehydrogenase, short chain dehydrogenase/reductase, aldehyde dehydrogenase, and cytochrome P450 in the control of retinoid signaling by activation of retinoic acid synthesis, *Biochemistry.* 24 (1996) 12221-7.
- [9] J. L. Napoli, Retinoic acid: its biosynthesis and metabolism, *Prog. Nucleic Acid Res.* 63: (2000) 139-188.
- [10] J. Labrecque, P. V. Bhat, and A. Lacroix, Purification and partial characterization of a rat kidney aldehyde dehydrogenase that oxidizes retinal to retinoic acid. *Biochem. Cell. Biol.* (1993) 85-89.
- [11] J. Labrecque, F. Dumas, A. Lacroix, and P. V. Bhat, A novel isozyme of aldehyde dehydrogenase specifically involved in the biosynthesis of 9-cis and all-trans retinoic acid. *Biochem. J.* 305 (1995) 681-684.

- [12] J. R. Mertz, E. Shang, R. Piantedosi, S. Wei., D. J. Wolgemuth, and W. S. Blaner, Identification and characterization of a stereospecific human enzyme that catalyzes 9-cis retinol oxidation. *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 33125-33131.
- [13] C. A. A. Driessen, Winkens, A. G., Kuhlmann, H. J., Janssen, A. P. M., VanVugt, A. H., Deutman, A. F., & J. J. M. Janssen. The visual cycle retinal dehydrogenase: possible involvement in the 9-cis retinoic acid biosynthetic pathway. *FEBS Lett.*, 428 (1998) 135
- [14] X. Chai, M. H. E. M. Boerman, Y. Zhai, and J. L. Napoli, Cloning of a cDNA for liver microsomal retinol dehydrogenase: A tissue-specific, short-chain alcohol dehydrogenase. *J. Biol. Chem.*, 270 (1995) 3900-3904.
- [15] X. Hebutterne, X. D., Wang, E. J., Johnson, N. L., Krinsky, and R. M. Russell. Intestinal absorption and metabolism of 9-cis-beta-carotene in vivo: biosynthesis of 9-cis-retinoic acid. *J. Lipid Res.* 36 (1995) 1264-1273.
- [16] J. Urbach, and R. R. Rando, Isomerization of all-trans retinoic acid to 9-cis retinoic acid. *Biochem. J.* 299 (1994) 459-465.
- [17] G. Duester, Families of retinoid dehydrogenases regulating vitamin A function: production of visual pigment and retinoic acid. *Eur. J. Biochem.* 267 (2000) 4315-4324.
- [18] I. Gagnon, G. Duester, and P. V. Bhat, Enzymatic characterization of recombinant mouse retinal dehydrogenase type 1. *Biochem. Pharmacol.* 65 (2003) 1685-1690.
- [19] I. Gagnon, G. Duester, and P. V. Bhat, Kinetic analysis of mouse retinal dehydrogenase type-2 (RALDH2) for retinal substrates. 1506 (2002) 156-162.
- [20] V. Montplaisir, V., N. Chow Lan, J. Guimond, C. Savineau, P. V. Bhat, and S. Mader. Recombinant class I aldehyde dehydrogenases specific for all-trans or 9-cis retinal. *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 17486-17492.
- [21] L-C Hsu, W-C Chang, I. Hoffmann, and G. Duester, Molecular analysis of two closely related mouse aldehyde dehydrogenase genes: identification of a role for Aldh1, but not Aldh-pb, in the biosynthesis of retinoic acid. *Biochem. J.* 15 (1999) 387-95.
- [22] M. Jordan, A. Schallhorn, and F. M., Wurm, Transfecting mammalian cells: optimization of critical parameters affecting calcium-phosphate precipitate formation. *Nucleic Acids Res.* 24 (1996) 596-601.

- [23] C. Lanvers, G. Hempel, G. Blaschke, and J. Boos. Chemically induced isomerization and differential uptake modulate retinoic acid disposition in HL-60 cells. *FASEB J.* 12 (1998) 1627-1633.
- [24] H. Brodeur, I. Gagnon, S. Mader, and P. V. Bhat, Cloning of monkey RALDH1 and characterization of retinoid metabolism in monkey kidney proximal tubule cells. *J. Lipid Res.* 44: (2003) 303-313.
- [25] Y. Yanagawa, J. C. Chen, L. C. Hsu, and A. Yoshida, The transcriptional regulation of human aldehyde dehydrogenase I gene. The structural and functional analysis of the promoter. *J. Biol. Chem.* 270: (1995) 17521-17527.
- [26] P.R. Sundaresan, and P. V. Bhat, Ion-pair high-pressure liquid chromatography of cis-trans isomers of retinoic acid in tissues of vitamin A sufficient rats. *J. Lipid Res.* 23 (1982) 448-455.
- [27] M. E. Cullum, and M. H. Zile, Metabolism of all-trans retinoic acid and all-trans retinyl acetate: demonstration of common physiological metabolites in rat small intestinal mucosa and circulation. *J. Biol. Chem.* 260 (1985) 10590-10596.
- [28] P. V. Bhat, and A. M. Jetten, Metabolism of all-trans retinol and all-trans retinoic acid in rabbit tracheal epithelial cells in culture. *Biochim. Biophys. Acta.* 922: (1987) 18-27.
- [29] R. Kojima, T. Fujimori, N. Kiyota, Y. Toriya, T. Fukuda, T. Ohashi, T. Sato, Y. Yoshizawa, K. I. Takeyama, H. Mano, S. Masushige, and S. Kato, In vivo isomerization of retinoic acids: rapid isomer exchange and gene expression. *J. Biol. Chem.* (1994) 32700-32707.
- [30] W. Liu, P. Hellman, Q. Li W-R Yu, C. Juhlin, H. Nordlinder, O. Rollman, G. Akerstrom, H. Törmä, and H. Melhus, Biosynthesis and function of all-trans- and 9-cis-retinoic acid in parathyroid cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 229 (1996) 922-929.
- [31] M. Lansink, A. M. Van Bennekum, W. S. Blazer, and T. Kooistra, Differences in metabolism and isomerization of all-trans retinoic acid and 9-cis retinoic acid between human endothelial cells and hepatocytes. *Eur. J. Biochem.* 247 (1997) 596-604.
- [32] F. A. Mic, A. Molotkov, D. M. Benbrook, and G. Duester, Retinoid activation of retinoic acid receptor but not retinoid X receptor is sufficient to rescue lethal defect in retinoic acid synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 100 (2003) 7135-7140.

- [33] T. Christina, C. Hofmann, and E. Eichele, 9-cis-retinoic acid, a potent inducer of digital pattern duplications in the chick wing bud. *Development*. 118 (1993) 957-965.
- [34] C. M. Viviano, C. E. Horton, M. Maden, and J. P. Brocks, Synthesis and release of 9-cis retinoic acid by the urodele wound epidermis. *Development*. 121 (1995) 3753-3762.
- [35] C. Horton, and M. Maden, Endogenous distribution of retinoids during normal development and teratogenesis in mouse embryo. *Dev. Dyn.* 202 (1995) 312-323.
- [36] S. M. Ulven, T. E. Gundersen, M. S. Weedon, V. O. Landaas, A. K. Sakhi, S. H. Fromm, B. A. Geronimo, J. O. Moskaug, and R. Blomhoff, Identification of endogenous retinoids, enzymes, binding proteins, and receptors during early postimplantation development in mouse: important role of retinal dehydrogenase type 2 in synthesis of all-trans-retinoic acid. *Dev. Biol.* 220 (2000) 379-391.
- [37] S. M. Ulven, T. E. Gundersen, A. K. Sakhi, J. V. Glover, and R. Blomhoff, Quantitative axial profiles of retinoic acid in the embryonic mouse spinal cord. *Dev. Dyn.* 222 (2001) 341-353.
- [38] W. A. Werner, and H. F. De Luca, Metabolism of a physiological amount of all-trans-retinol in vitamin A-deficient rats. *Arch. Biochem. Biophys.* 393 (2001) 262-270.
- [39] W. S. Blaner, Cellular metabolism and actions of 13-cis retinoic acid. *J. Am. Acad. Dermatol.* 45(2001) S129-135.
- [40] J. Paik, W. S. Blaner, and K. Swisshelm, Cis-retinol dehydrogenase: 9-cis-retinol metabolism and its effect on proliferation of human MCF7 breast cancer cells. *Exptl. Cell Res.* 303 (2005) 183-196.
- [41] K. Niedereither, V. Subbarayan, P. Dolle, and P. Chambon. Embryonic retinoic acid synthesis is essential for early mouse post-implantation development. *Nature Genetics*, 21 (1999) 444-448.

4.8 Figure Legends

Figure 4.1. Selectivity of chimeric ALDHs for retinal isomer substrates

Construction of Chimeras between RALDH and Pb-ALDH and activity assays of recombinant enzymes were described earlier (20).

Figure 4.2. Purity of the all-*trans* and 9-*cis* RA isomers used in the metabolic studies

A and B: HPLC separation of all-*trans* RA (A) and UV spectrum of the peak eluting at 5.39 min (B). C and D: HPLC analysis of 9-*cis* RA (C) and UV spectrum of the peak eluting at 5.03 min (D).

Figure 4.3. Absence of RA isomerization activity in HeLa cells

A: HPLC analysis of cell-associated RA in cells incubated with 1 μ M all-*trans* RA for 3 h at 37°C. B: Corresponding UV spectrum of the peak eluting at 5.1 min. C: HPLC separation of cell-associated RA in cells incubated with 1 μ M 9-*cis* RA for 3 h at 37°C. D: Corresponding UV spectrum of the peak eluting at 4.8 min.

Figure 4.4. Absence of RA isomerization activity in HeLa cells expressing recombinant ALDHs

A: Levels of cell-associated all-*trans* (black bars) or 9-*cis* (grey bars) RA in HeLa cells expressing various ALDHs, as indicated, after incubation with 1 μ M all-*trans* RA for 3 h at 37°C. B: Levels of cell-associated all-*trans* (black bars) or 9-*cis*

(grey bars) RA in HeLa cells expressing various ALDHs, as indicated, after incubation with 1 μ M 9-*cis* RA for 3 h at 37°C.

Figure 4.5. Absence of RA isomerization activity in RALDH1-expressing JTC12 and HepG2 cells

Expression levels of native RALDH1 in lysates from JTC12 (left) or HepG2 (right) cells were monitored by Western blotting (A), and RALDH1 activity was assessed by *in vitro* enzymatic assay with all-*trans* (black bars) or 9-*cis* (grey bars) retinal (B). The cells were incubated with all-*trans* (C) or 9-*cis* (D) RA isomers (1 μ M) for 3 h at 37°C, after which cell-associated retinoids were extracted, separated, identified and quantified by HPLC. Levels of all-*trans* (black bars) or 9-*cis* (grey bars) RA accumulated in the cells are shown.

Figure 4.6. Transiently expressed chimeric ALDHs are selective for retinal substrates *in vitro*

HeLa cells were transiently transfected with expression vectors for parental or chimeric ALDHs for 48 h as described in Materials and Methods. Whole cell lysates were prepared by freeze-thawing the cells in 20 mM Tris-HCl (pH 7.4) containing 1 mM EDTA, 100 mM NaCl, and a mixture of protease inhibitors. Protein expression levels were monitored by Western blot analysis of 20 μ g of each whole cell lysate (A) and retinal oxidizing activity in the whole cell extracts expressing recombinant ALDHs, as indicated, were assayed in the presence of all-

trans (black bars) or 9-*cis* (grey bars) retinal. Values are mean \pm SD of 3 determinations.

Figure 4.7. Purity of standard retinal isomers used for *in vivo* RA synthesis

A and B: HPLC profile of all-*trans* retinal (A) and UV spectrum of the peak eluting at 12.36 min (B). C and D: HPLC analysis of 9-*cis* retinal (C) and UV spectrum of the peak eluting at 11.46 min (D).

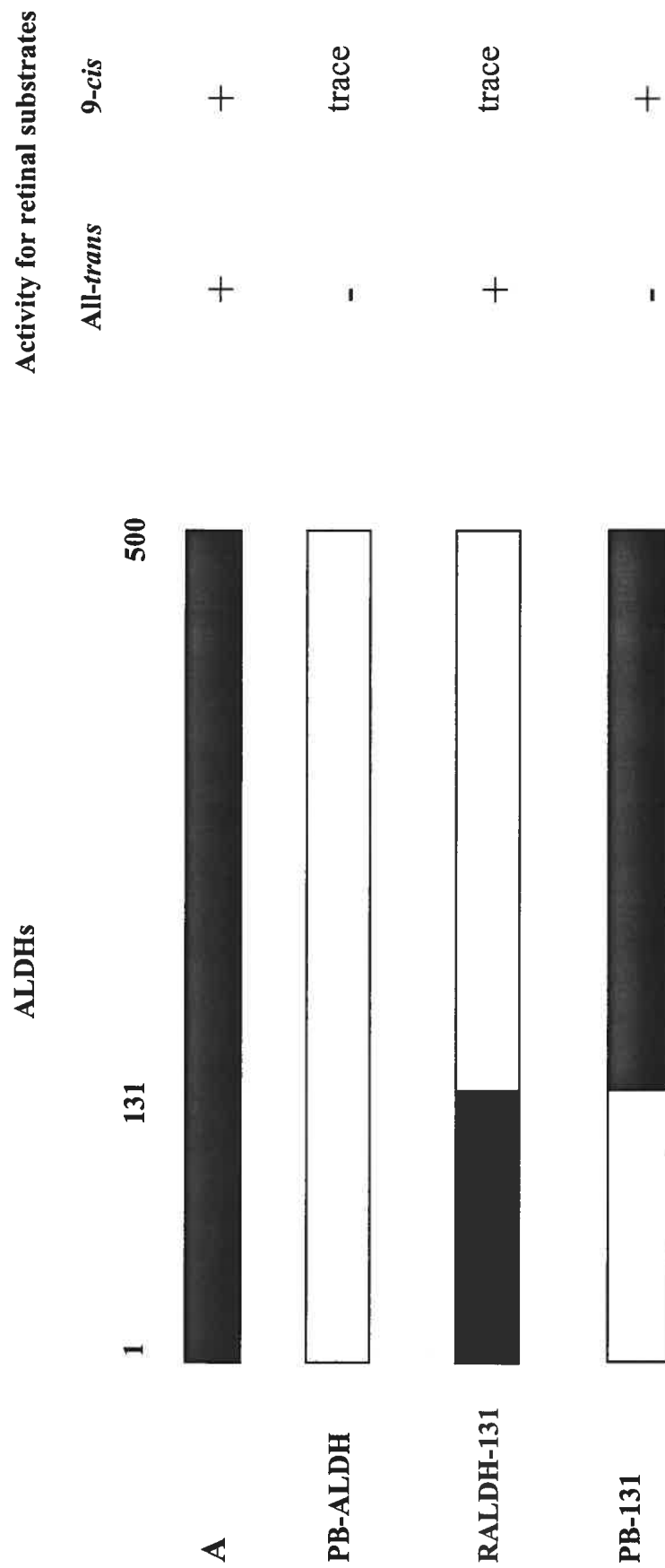
Figure 4.8. Conversion of retinal isomers to the corresponding RA and retinol isomers without isomerization in cultured HeLa cells expressing recombinant ALDHs

HPLC analysis of lipid extracts from HeLa cells transiently expressing wild type RALDH (A, E), RALDH-131 (C) or PB-131 (G), incubated with all-*trans* retinal (A,C) or 9-*cis* retinal (E, G) for 3 h at 37°C. UV scanning of the compounds eluting at ~5.1min (B, D) or ~4.8 min (F, H), respectively.

Figure 4.9. Transiently expressed chimeric ALDHs direct isomer-selective RA synthesis *in vivo*

Levels of all-*trans* (black bars) and 9-*cis* (grey bars) RA synthesized from all-*trans* (A) or 9-*cis* (B) retinal were quantitated by HPLC analysis of lipid extracts from HeLa cells expressing recombinant ALDHs, as in Fig. 6. Values are average of 2 determinations.

Figure 4.1



Mili Absorbance Unit (330 nm)

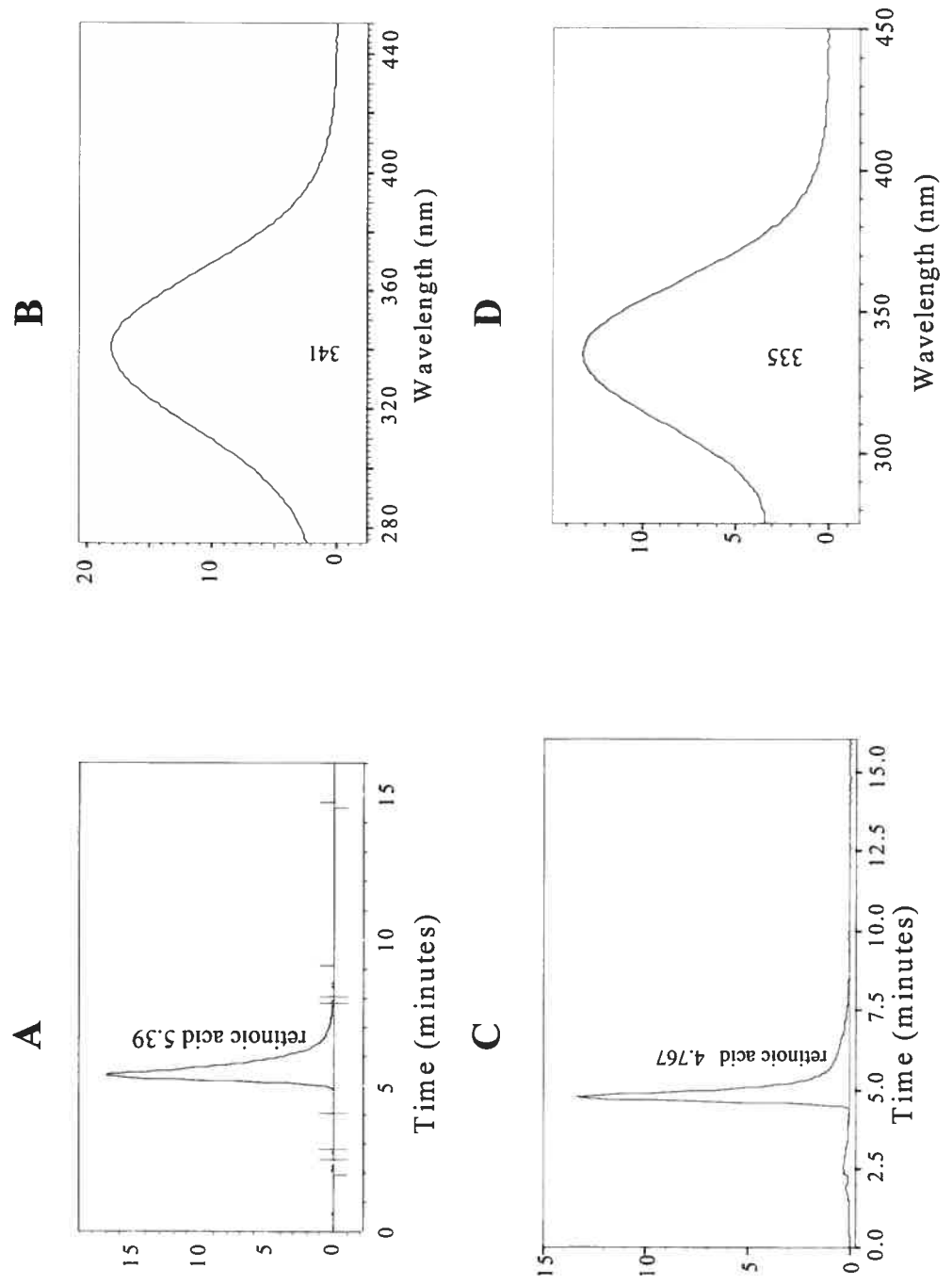


Figure 4.2

Mili Absorbance Unit (330 nm)

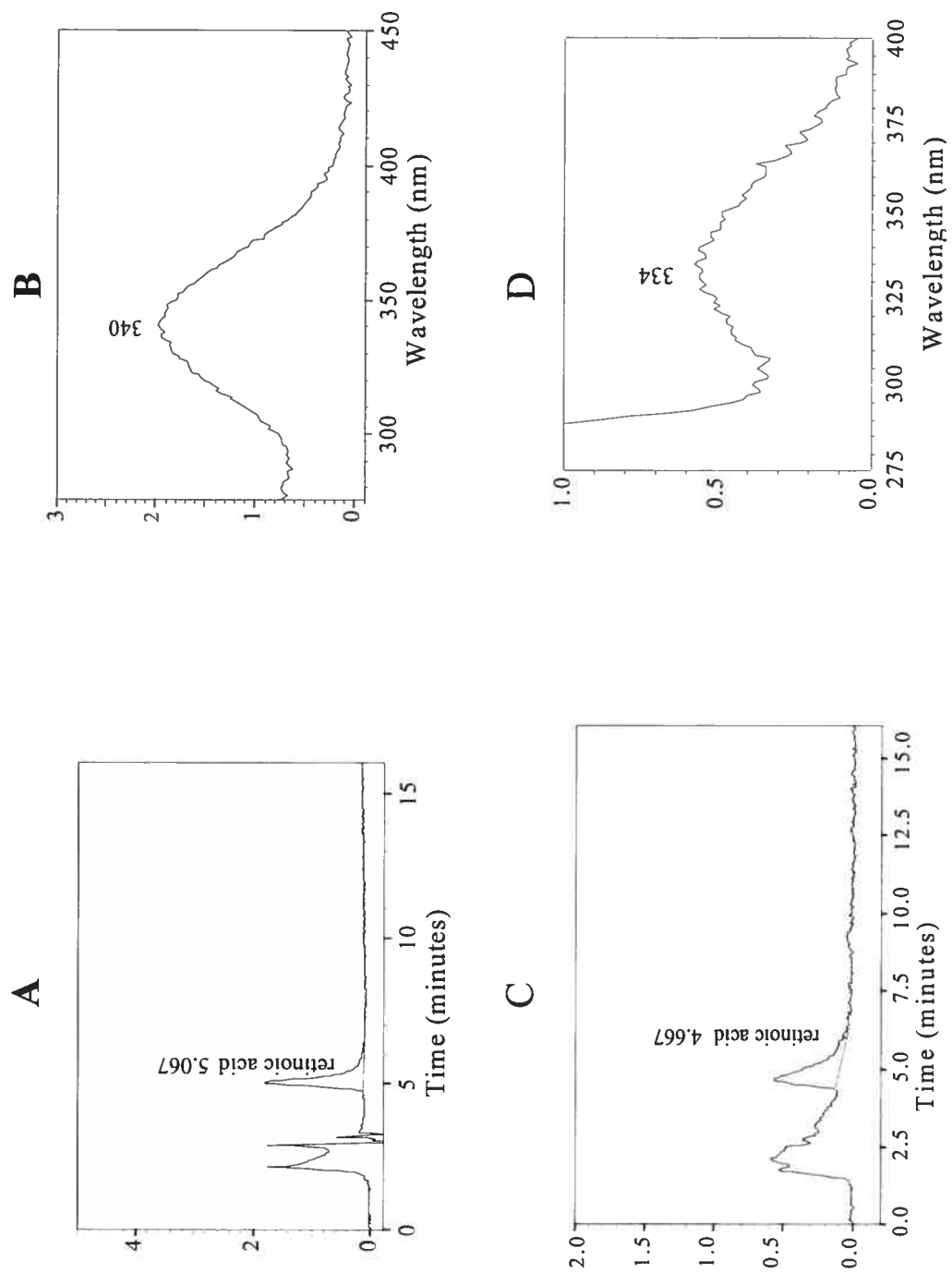
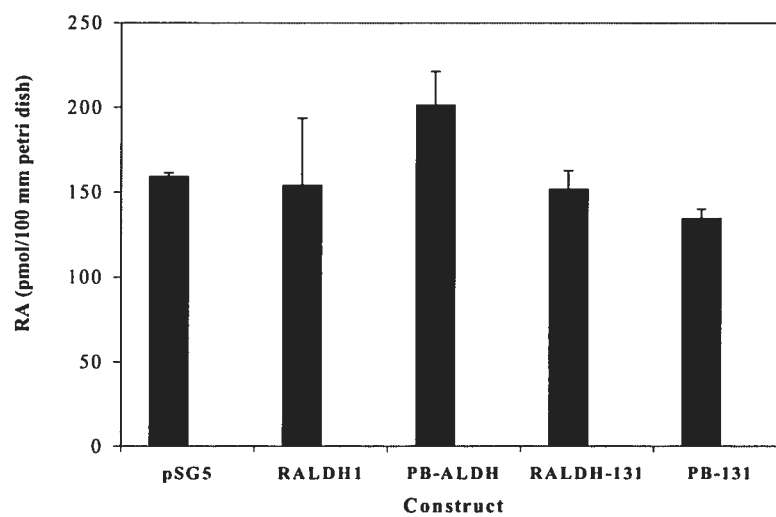


Figure 4.3

Figure 4.4

A



B

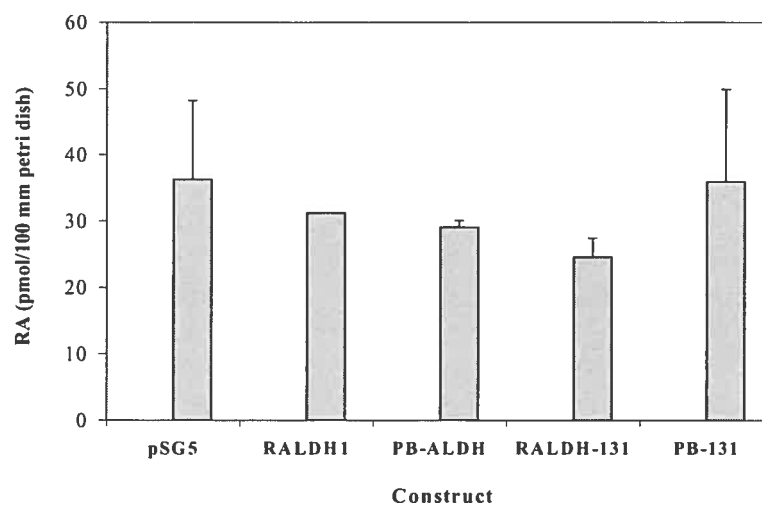


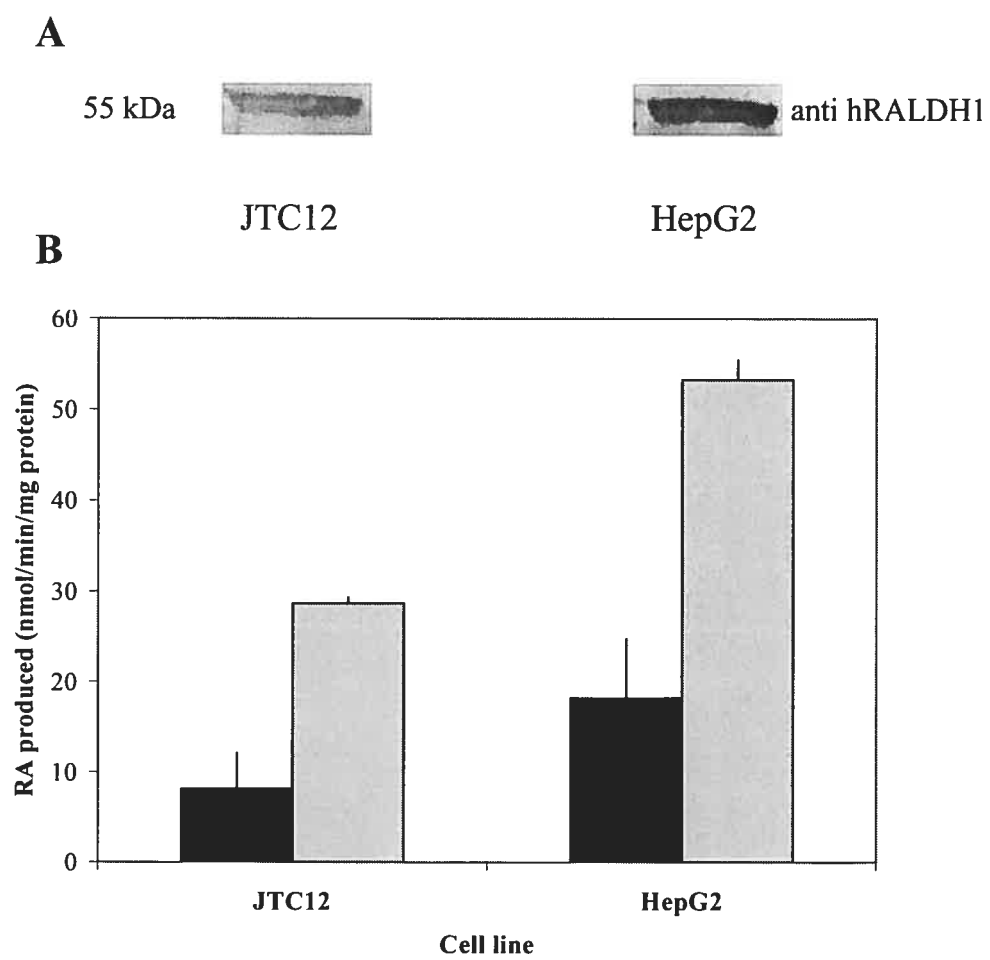
Figure 4.5

Figure 4.5 (suite)

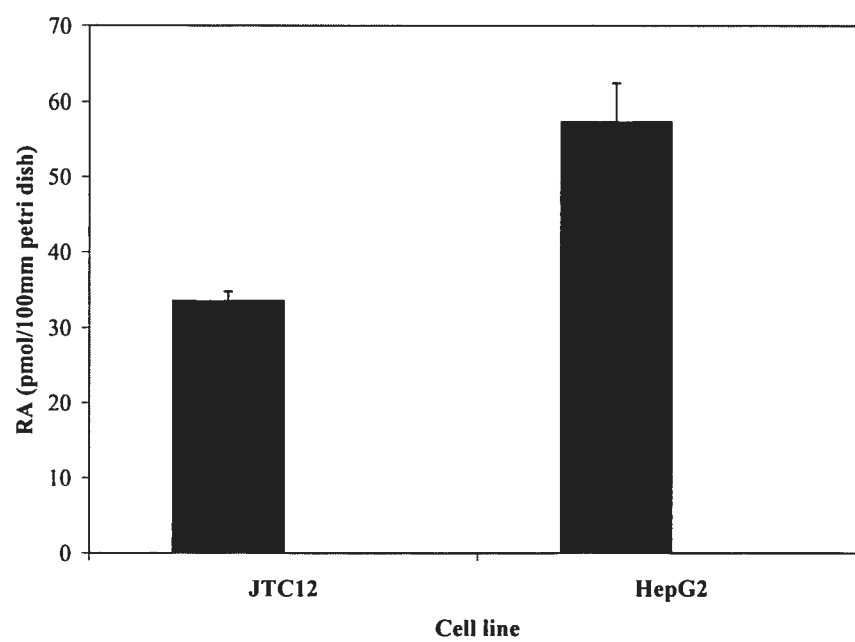
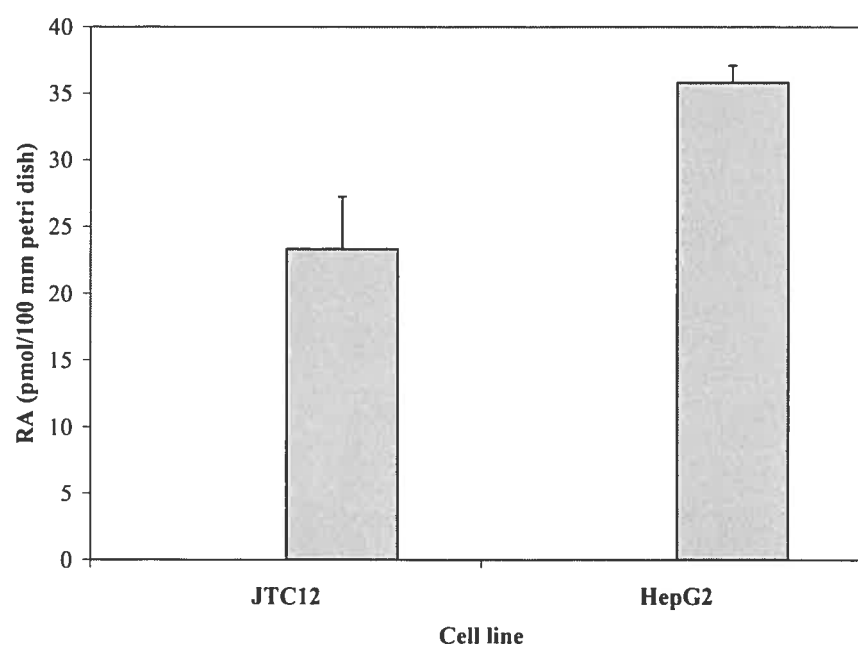
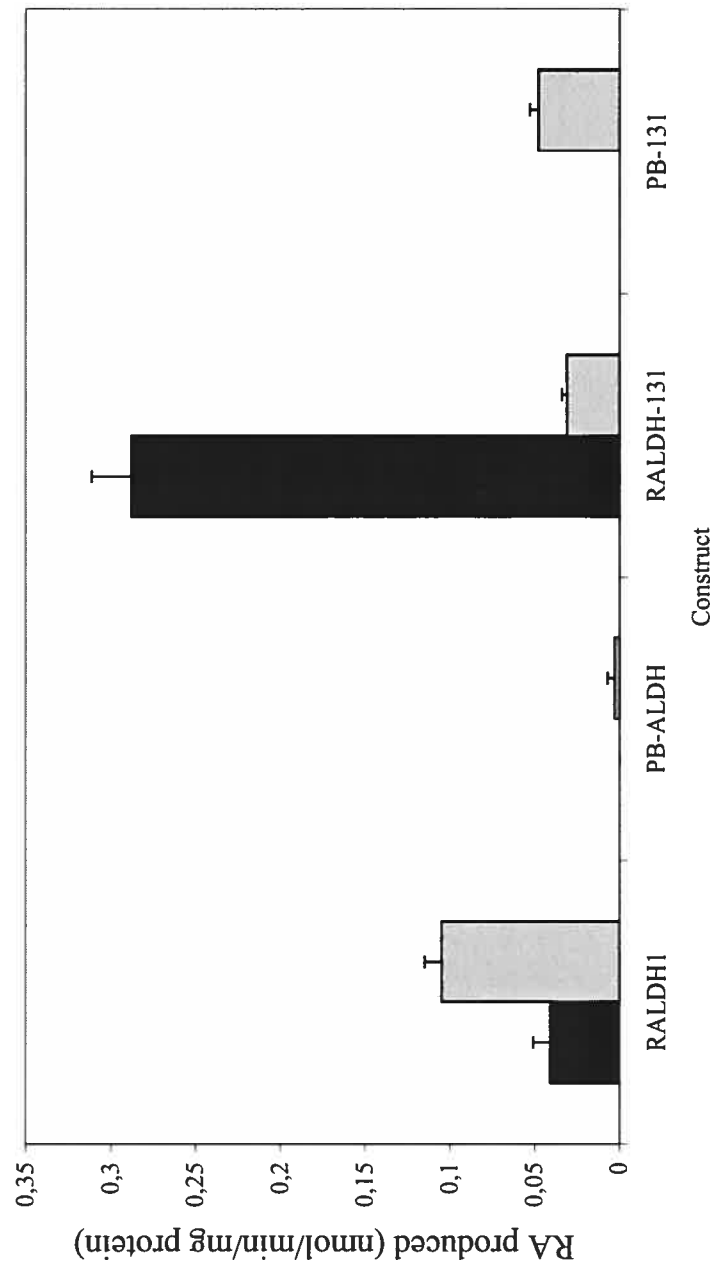
C**D**

Figure 4.6



A



B

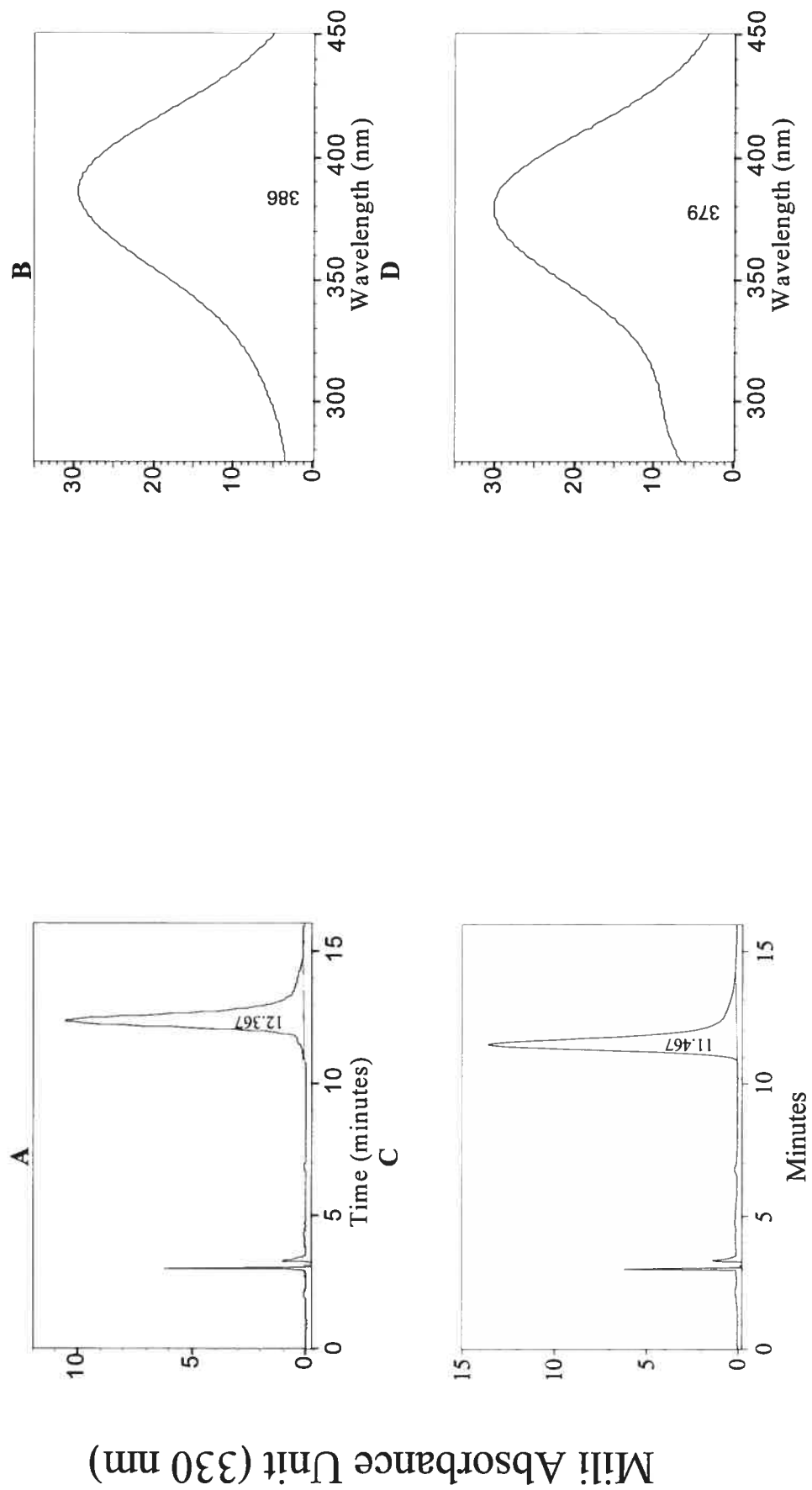


Figure 4.7

Figure 4.8

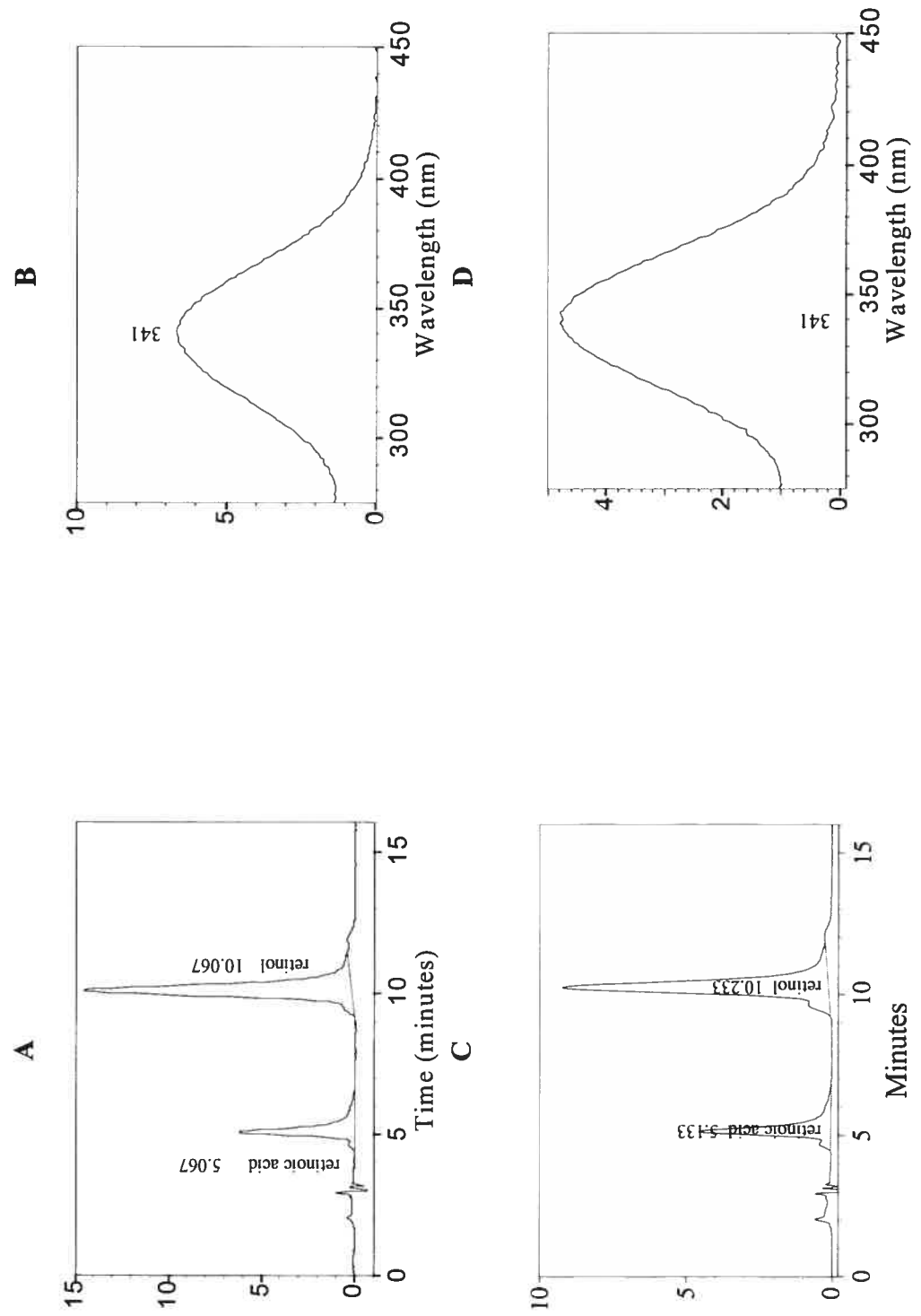


Figure 4.8 (suite)

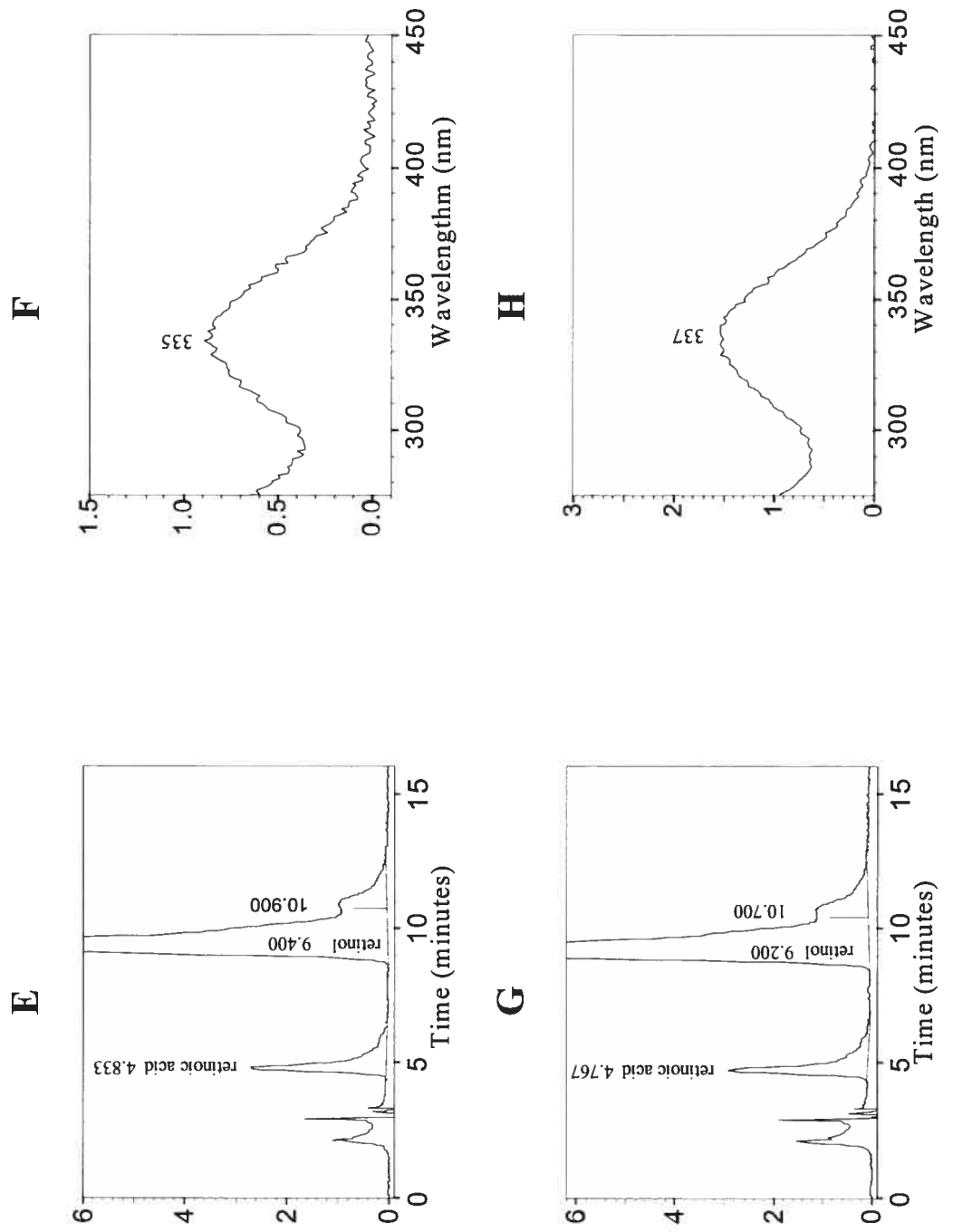
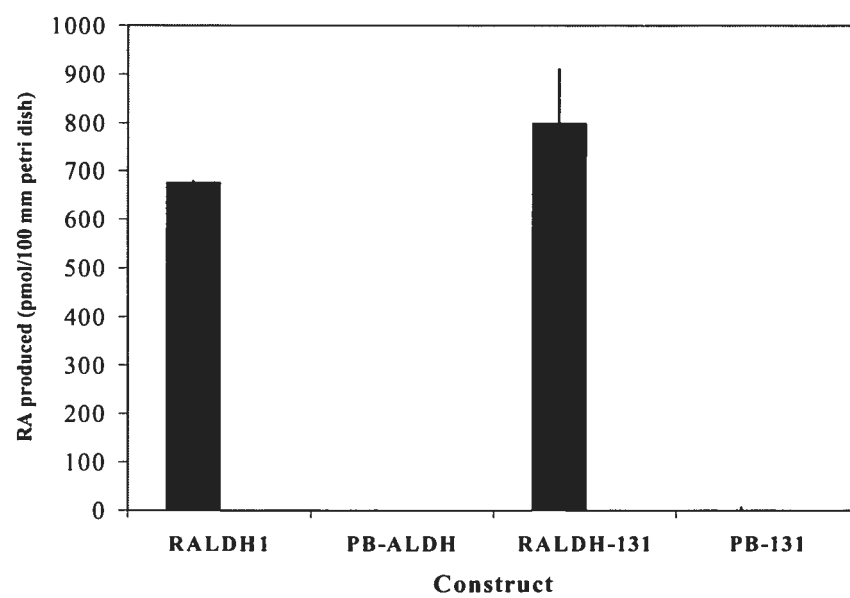
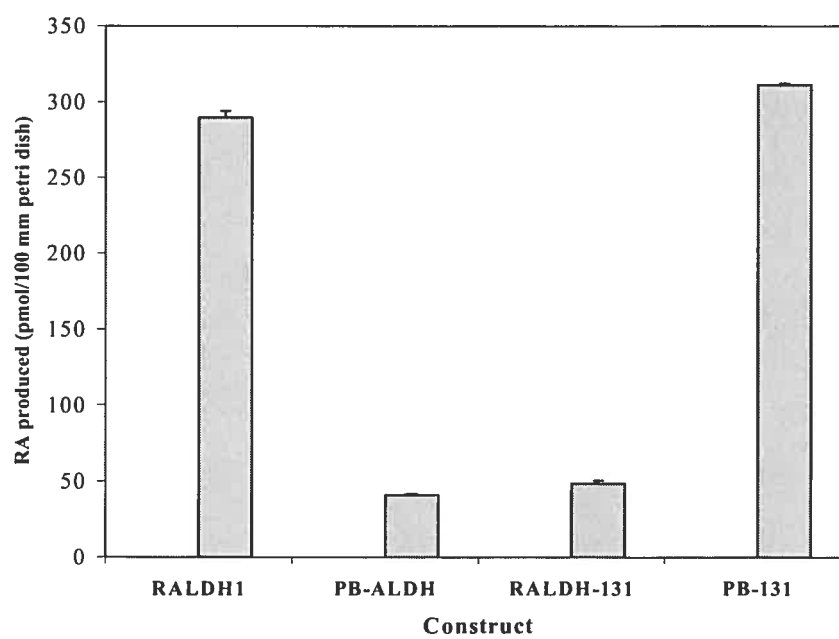


Figure 4.9

A



B



CHAPITRE 5

Discussion

Cette thèse a permis, dans un premier temps, de caractériser une RALDH1, à partir des cellules JTC12, qui possède plusieurs caractéristiques semblables à la RALDH1 humaine dont sa capacité à oxyder le 13-*cis* RAL, et dans un second temps, à l'aide d'enzymes aldéhydes déshydrogénases de classe 1, sauvages ou chimériques, endogènes ou exprimées de manière transitoire, d'étudier le métabolisme de l'AR dans les cellules JTC12 et les cellules HeLa où nous avons observé l'absence d'isomérisation du substrat et du produit. Les données présentées dans cette thèse sont les bases pour d'éventuelles études *in vivo* sur le métabolisme des AR tout-*trans* et 9-*cis* et leurs fonctions dans l'organisme, et nous permettront de développer des outils afin d'étudier le métabolisme des rétinoïdes 13-*cis*.

Les voies de synthèse des formes 9-*cis* et 13-*cis* de l'AR sont toujours inconnues. Trois voies de synthèse sont suggérées pour l'AR 9-*cis*. La première voie est l'oxydation en deux étapes du 9-*cis* ROL en AR 9-*cis*. La seconde est la production d'AR 9-*cis* à partir du 9-*cis* β -carotène de l'alimentation (Wang et coll., 1994). Et la troisième voie, l'isomérisation de la forme tout-*trans* en 9-*cis* de manière non-enzymatique, a été démontrée dans des extraits de tissus (Urbach et Rando, 1994a). Plusieurs enzymes ont démontré leur capacité à oxyder les tout-*trans*, 9-*cis* et 13-*cis* ROLs en leur RALs correspondants (Duester, 2000 ; Napoli, 2000 ; Mertz et coll., 1997) ainsi que l'oxydation de ces RALs en ARs (Duester, 2000). Lors d'études enzymatiques avec ces mêmes enzymes,

recombinantes ou purifiées, les rétinoïdes n'ont présenté aucun changement de conformation durant l'oxydation *in vitro* du ROL en AR (Chapitres 2 et 3 ; Gagnon et coll., 2002, 2003 ; Labrecque et coll., 1995 ; Paik et coll., 2000). De plus, les études effectuées dans les modèles cellulaires, JTC12 et HeLa, présentées aux chapitres deux et quatre, ont confirmé que l'isomère produit conservait la conformation de son précurseur. Ces données suggèrent que l'isomérisation de l'AR tout-*trans* en l'isomère 9-*cis* ne serait pas une voie de synthèse mais que l'isomère 9-*cis* aurait une voie de synthèse similaire à la conformation tout-*trans*.

Les résultats obtenus avec les chimères RALDH-131 et PB-131, la spécificité de substrat et l'absence d'isomérisation du produit, nous permettent de croire que la génération de souris transgéniques ne produisant que l'AR 9- *cis* ou l'AR tout-*trans* permettrait de déterminer le rôle de chacun des isomères et les organes cibles s'il y a lieu. L'enzyme RALDH2 qui catalyse les trois isoformes du RAL (Gagnon et coll., 2002) est la première RALDH exprimée lors de l'embryogénèse chez la souris (Niederreither et coll., 2002b) et lorsque que son gène est annulé, il y a mort de l'embryon (Niederreither et coll., 1999). L'expression des enzymes chimériques substrat spécifique, RALDH-131 et PB-131, sous le contrôle du promoteur de RALDH2, chez des souris déficientes en RALDH2, pourraient révéler le rôle des isomères tout-*trans* et 9-*cis* dans le développement et l'importance de la liaison de l'AR 9-*cis* avec les récepteurs RXRs et RARs.

Cependant, la redondance des RALDHs et des récepteurs pourrait fausser les effets observés.

Il semblerait que l'AR 13-*cis* soit plus actif que prévu et ce, même s'il n'intervient pas via les récepteurs nucléaires. Qu'en est-il de la synthèse de cet isomère *in vivo* ? Certaines enzymes RALDHs (Bhat et coll., 1998 ; Brodeur et coll., 2003, Gagnon et coll., 2002) ont la capacité d'oxyder le 13-*cis* RAL, suggérant qu'une voie de synthèse à partir du 13-*cis* ROL est envisageable comme pour les isomères tout-*trans* et 9-*cis*.

La RALDH1 de singe, clonée à partir des cellules du tubule proximal de rein (JTC12), a la capacité d'oxyder les trois RALs, tout-*trans*, 9-*cis* et 13-*cis*, en leur acide correspondant, contrairement aux RALDH1s de rat et de souris qui ne peuvent oxyder le 13-*cis* RAL. Il serait alors très intéressant d'utiliser cette enzyme afin de déterminer les régions de la protéine, impliquées dans l'oxydation du 13-*cis* RAL, sachant que l'enzyme RALDH1 de rat possède deux régions spécifiques pour l'oxydation des tout-*trans* et 9-*cis* RALs, soient les résidus 1 à 131 et les résidus 132 à 343, respectivement (Montplaisir et coll., 2002). La génération de chimères entre la RALDH1 de singe et la RALDH1 de rat permettraient de conférer à la RALDH1 de rat la capacité d'oxyder le 13-*cis* RAL. Une fois la région ciblée, la génération d'une chimère entre la RALDH1 de singe et la PB-ALDH1 confirmerait que cette région est responsable de l'oxydation de cet isomère. Des études comparatives des séquences des RALDH1s de

différentes espèces, jumelées à de la mutagénèse dirigée, permettraient d'identifier les acides aminés essentiels pour l'oxydation des trois isomères et de mieux comprendre la spécificité de substrat. Selon les études de cristallographie sur la RALDH1 de mouton (Moore et coll., 1998, 1999), le tunnel d'entrée du substrat est composé des hélices αC et αH , ainsi que de la boucle précédant l'hélice αN . Dans ces régions, des substitutions d'acides aminés sont retrouvées chez les RALDH1s d'espèces différentes et pourraient être responsable de leur capacité à oxyder les divers isomères. Dans la boucle, les séquences de rat et de souris ont trois acides aminés identiques qui diffèrent de ceux retrouvés dans les séquences humaine et de singe. Par contre, ces mêmes résidus diffèrent également entre la RALDH1 de singe et la RALDH2 de rat qui est aussi capable de catalyser le 13-*cis* RAL. Cependant, plusieurs résidus sont communs aux RALDH1, humaine et de singe, et à la RALDH2 de rat, tout en étant différents chez les RALDH1 de souris et de rat. En ciblant d'abord une région, il sera plus facile, par la suite, d'identifier les résidus impliqués dans la spécificité de substrat. L'utilisation d'une enzyme spécifique pour la production d'AR 13-*cis* et le modèle cellulaire développé dans notre laboratoire pourraient s'avérer des outils très intéressants pour étudier les mécanismes d'action de cette isoforme et le métabolisme de l'AR 13-*cis in vivo*.

5.1 Projets futurs

5.1.1 La RALDH1 et le VIH

Un traitement à long terme à l'AR peut causer des effets secondaires comme de l'alopécie, des lésions inflammatoires de la peau, de la paronychie, de l'hyperlipidémie. Ces mêmes symptômes sont retrouvés chez des patients atteints du VIH, sous traitement aux anti-rétroviraux (ARV) (Toma et coll., 2001). Le métabolisme de l'AR serait affecté par ces inhibiteurs de protéases (IP), au niveau de sa synthèse et de son catabolisme. Parmi les mécanismes possibles, il y a la séquestration du CRABP1 par les inhibiteurs de protéases, due à son homologie de 58% avec la région catalytique de la protéase HIV-1. Si CRABP1 est lié aux anti-rétroviraux, il ne peut lier le RAL et favoriser son oxydation, d'où une diminution de la synthèse d'AR (Calza et coll., 2003). Un autre mécanisme possible est l'action directe des inhibiteurs de protéases sur les RALDHs, et plus particulièrement les RALDH1s. Il a été démontré que les IPs pouvaient inhiber l'expression du gène de la RALDH1 mais aussi augmenter son activité (Toma et coll., 2001). Cette diminution de synthèse d'AR, principalement de l'isoforme 9-*cis*, résulte en une diminution de l'activation de l'hétérodimère RXR-PPAR qui se traduit, entre autre, par une augmentation de l'apoptose des adipocytes, une diminution de leur prolifération et une hyperlipidémie suite à la libération des lipides dans le sang (Calza et coll., 2003). Par contre, une augmentation de l'activité de l'enzyme RALDH1 aurait pour effet d'augmenter la synthèse d'AR, d'où une accumulation d'AR dans les cellules conduisant aux effets secondaires

observés (Toma et coll., 2001). Une meilleure connaissance du métabolisme de l'AR 9-*cis* et des enzymes impliquées, les RALDHs, ainsi que leur interaction avec les inhibiteurs de protéases et les autres ARVs permettraient de mieux comprendre les mécanismes d'action et de développer des traitements ayant des effets secondaires moindres.

5.1.2 La cristallisation

Des études de cristallisation des enzymes sauvages et chimériques, mutées ou non, en présence du substrat, permettraient d'étudier les interactions entre ces deux éléments et de déterminer les résidus importants pour l'oxydation des différentes isoformes, afin de mieux comprendre la réaction enzymatique. Certaines cellules présentent une résistance à diverses drogues utilisées, comme le cyclophosphamide, causée par la présence de la RALDH1 qui inactive la drogue (Manthey et coll., 1990). Les données obtenues suite à la cristallisation pourraient servir à produire des anticorps monoclonaux qui inactiveraient l'enzyme de manière spécifique et ainsi réduire la résistance au traitement. Il pourrait être également possible de générer des molécules qui logeraient dans la poche catalytique pour inhiber l'activité enzymatique et par le fait même, la synthèse d'AR. Il serait aussi envisageable, en connaissant les régions importantes de l'activité catalytique, de cibler l'oxydation de molécules précises à l'aide de chimères spécifiques. Ces dernières pourraient, avec la technologie

grandissante, être couplées à une protéine qui ciblerait un type cellulaire en particulier.

Les ARVs sont un bon traitement pour ralentir le VIH, cependant, ils semblent affecter le métabolisme de l'AR au niveau des RALDH1s. Il reste à déterminer s'ils agissent sur l'expression du gène ou bien lient l'enzyme pour favoriser ou empêcher l'oxydation du RAL. Des études sur la structure de l'enzyme-substrat, en combinaison avec de la modélisation moléculaire, pourrait permettre de générer des médicaments de haute efficacité et de grande spécificité qui, en n'agissant pas sur le métabolisme de l'AR que l'on sait important dans plusieurs voies métaboliques, réduiraient les effets observés avec les traitements actuels.

Aussi, une bonne connaissance de la structure enzyme/substrat et du mécanisme enzymatique pourrait conduire à la synthèse de rétinoïdes qui seraient moins toxiques pour l'organisme et constitueraient de meilleurs agents thérapeutiques en suivant la même voie métabolique que le RAL.

5.1.3 L'expression des RALDHs dans les cellules cancéreuses

La méthylation des îlots CpG des promoteurs de gènes suppresseurs de tumeur a été remarquée dans plusieurs types de tumeurs. Un traitement de déméthylation a pour effet d'induire l'expression du gène rendu silencieux par la méthylation, de stimuler la différenciation ou l'apoptose et diminuer ainsi la tumeur (Momparler,

2005). L'AR est de plus en plus utilisé comme traitement contre le cancer où il inhibe la prolifération cellulaire pour induire la différenciation et l'apoptose (Gottardis et coll., 1996), comme les inhibiteurs de méthylation. L'efficacité du traitement à l'AR suggère que sa synthèse est probablement altérée dans les tumeurs et que son absence affecte leur cycle cellulaire. Dans les cellules de cancer de la prostate, le promoteur de la RALDH2 est hyperméthylé, inhibant l'expression de l'enzyme et, par le fait même, la synthèse d'AR dans ces cellules. La réexpression de l'enzyme RALDH2, par transfection, a un effet suppresseur de tumeur au même titre qu'un traitement à l'AR (Kim et coll., 2005). Dans les MCF-7, la RALDH3 n'est pas exprimée comparativement aux cellules épithéliales de glande mammaire normale (Rexer et coll., 2001). Cette déficience au niveau de la synthèse de l'AR pourrait expliquer pourquoi les cellules ne se différencient plus. Lorsque la RALDH3 est réexprimée, suite à une transfection, la production d'AR est rétablie (Rexer et coll., 2001). Cependant, il reste à déterminer si son absence est due à la méthylation du promoteur.

Le rétablissement de la fonction RALDH dans les cellules tumorales permettrait à nouveau la synthèse d'AR, d'induire la différenciation et ainsi ralentir la progression de la maladie. Le traitement des personnes atteintes du syndrome myélodysplasique, caractérisé par une cytopénie périphérique et une dysplasie des cellules hématopoïétiques progénitrices, à l'aide d'inhibiteurs d'ADN méthyltransférases, azacitidine et decitabine, donne de bons résultats. Un impact significatif sur la qualité de vie des patients a été observé et dans certains cas sur

leur survie (Issa, 2005). Des études sur l'expression des différentes RALDHs dans les lignées tumorales puis sur la méthylation de leur promoteur permettraient d'identifier les types de tumeurs où la synthèse d'AR est déficiente. Avec ces données, il serait possible de développer des stratégies de traitement alliant l'AR et les inhibiteurs de méthylation. Dans le cas où l'absence d'expression serait due à une mutation du gène, la thérapie génique pourrait être envisagée. Une nouvelle technologie de pointe utilisant les doigts de zinc couplés à une nucléase a permis d'introduire un gène normal chez l'humain, afin de remplacer, de manière permanente, le gène muté (Urnov et coll., 2005). S'il advenait qu'une mutation au niveau des RALDHs empêchait leur expression ou bien leur bon fonctionnement, cette technique révolutionnaire permettrait de rétablir la synthèse d'AR.

En connaissant mieux la régulation du gène, les modifications post-traductionnelles, la structure de l'enzyme en présence du substrat, il sera peut-être possible de relancer la synthèse de l'AR dans les cellules déficientes.

Conclusion

Depuis la découverte des récepteurs à l'AR, beaucoup d'études ont été faites pour mieux comprendre le mécanisme de régulation par l'AR. Les étapes conduisant à la production de l'AR tout-*trans* sont bien connues et son rôle dans l'organisme aussi. Par contre, il reste beaucoup à découvrir sur l'AR 9-*cis*, l'autre ligand des récepteurs RARs et le seul ligand des RXRs. La majorité des enzymes RALDHs sont capables d'oxyder les deux isomères *in vitro* et leur fonction *in vivo* a également été démontrée. Le 9-*cis* rétinol est présent dans le foie et les reins, mais est-il oxydé en AR 9-*cis* dans ces tissus ou bien est-il isomérisé en AR tout-*trans* ? L'AR 9-*cis* a-t-il une fonction *in vivo*, lie-t-il vraiment le RXR, joue-t-il un rôle dans la régulation des gènes ? L'AR 13-*cis* est aussi très utilisé comme agent thérapeutique mais ses mécanismes d'action ne sont pas encore connus. Lie-t-il un récepteur, est-il transformé en une autre isoforme, agit-il via une autre voie ? Ce sont toutes des questions qui sont posées depuis plusieurs années et les outils développés dans notre laboratoire sont un pas de plus pour y répondre.

La construction des chimères RALDH131 et PB131, spécifiques pour le tout-*trans* RAL et le 9-*cis* RAL respectivement, et prochainement, celle d'un chimère spécifique pour le 13-*cis*, nous ouvre la porte pour plusieurs études. Tout d'abord, des études de structure permettront de mieux comprendre la spécificité du substrat, d'identifier les résidus importants pour la liaison du substrat, du cofacteur et des inhibiteurs. Des études *in vivo*, à l'aide de souris transgéniques, sont aussi envisagées afin de déterminer le rôle des isoformes de l'AR (tout-*trans*

et 9-*cis*) dans le développement embryonnaire et leur importance. De plus, la caractérisation de la RALDH1 de singe nous a permis de développer un modèle cellulaire pour l'étude du métabolisme de l'AR.

Il a clairement été démontré que l'AR jouait un rôle important dans l'induction de la différenciation cellulaire et l'apoptose dans les cellules tumorales. Les rétinoïdes naturels sont toxiques à forte concentration et les cellules les catabolisent pour éliminer leurs effets toxiques. Il est possible de générer des rétinoïdes synthétiques ayant les propriétés bénéfiques de l'AR, mais sans les effets néfastes. L'enzyme RALDH1 de rat présente des régions spécifiques pour l'oxydation des isoformes tout-*trans* et 9-*cis*. Mieux connaître les acides aminés impliqués dans cette oxydation grâce à des études de mutagenèse dirigée et de cristallisation de l'enzyme en présence du substrat, pourrait permettre de développer des rétinoïdes moins toxiques pour l'organisme qui seront métabolisés *in vivo*.

La voie de synthèse de l'AR et son implication dans divers systèmes et pathologies sont en voie d'être élucidées. Les RALDHs semblent jouer un rôle important dans les effets de l'AR. Il va sans dire que dans les années à venir l'étude de ces enzymes sera en plein essor et qu'il s'agit d'un domaine prometteur.

Bibliographie

Abu-Abed S.S., Beckett B.R., Chiba H., Chithalen J.V., Jones G., Metzger D., Chambon P., Petkovich M. 1998 Mouse *P450RAI* (CYP26) expression and retinoic acid-inducible retinoic acid metabolism in F9 cells are regulated by retinoic acid receptor γ and retinoid X receptor α . *J. Biol. Chem.* **273** (4) 2409-2415.

Abu-Abed S., Dollé P., Metzger D., Beckett B., Chambon P., Petkovich M. 2001 The retinoic acid-metabolizing enzyme, CYP26A1, is essential for normal hindbrain patterning, vertebral identity, and development of posterior structures. *Genes Dev.* **15** 226-240.

Ambroziak W., Gonzalo I., Pietruszko R. 1999 Metabolism of retinaldehyde and other aldehydes in soluble extracts of human liver and kidney. *J. Biol. Chem.* **274** 33366-33373.

Armstrong J.L., Redfern C.P.F., Veal G.J. 2005 13-*cis* retinoic acid and isomerisation in paediatric oncology-is changing shape the key to success? *Biochem. Pharmacol.* **69** 1299-1306.

Armstrong R.B., Ashenfelter K.O., Eckhoff C., Levin A.A., Shapiro S.S. 1994 General and reproductive toxicology of retinoids. In: *The retinoids: Biology, Chemistry, and Medicine*. M.B. Sporn, A.B. Roberts, and D.S. Goodman, éditeurs. Raven Press Ltd, New York, 545-572.

Balmer J.E., Blomhoff R. 2002 Gene expression regulation by retinoic acid. *J. Lipids Res.* **43** 1773-1808.

Banfi P., Lanzi C., Falvella F.S., Gariboldi M., Gambetta R.A., Dragani, T.A. 1994 The daunorubicin-binding protein of M_r 54 000 is an aldehyde dehydrogenase and is down-regulated in mouse liver tumors and in tumors cell lines. *Mol. Pharmacol.* **46** 896-900.

Barua, A.B. 1997 Retinoyl β -glucuronide: a biological active form of vitamin A. *Nutr Rev.* **55** 259-267.

Benbrook D., Lernhardt E., Pfahl M. 1988 A new retinoic acid receptor identified from a hepatocellular carcinoma. *Nature* **333** 669-672.

Bennett A.F., Buckley P.D., Blackwell L.F. 1983 Inhibition of the dehydrogenase activity of sheep liver cytoplasmic aldehyde dehydrogenase by magnesium ions. *Biochemistry* **22** 776-784.

Bhat P.V. 1998a Retinal dehydrogenase gene expression in stomach and small intestine of rats during postnatal development and in vitamin A deficiency. *FEBS lett.* **426** 260-262.

Bhat P.V., Bader T., Nettesheim P., Jetten A.M. 1998a Differentiation-dependent regulation of retinal dehydrogenase gene expression in the trachea. *Biochem Cell Biol.* **76** 59-62.

Bhat P.V., Co H.T., Lacroix A. 1983 Effect of 2-alkanols on the separation of geometric isomers of retinol in non-aqueous high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* **260** 129-134.

Bhat P.V., De Luca L.M., Adamo S., Akalovsky I., Silverman-Jones C.S., Peck J.L. 1979 Retinoid metabolism in spontaneously transformed mouse fibroblasts (Balb/c 3T12-3 cells): enzymatic conversion of retinol to anhydroretinol. *J. Lipid Res.* **20** 357-362.

Bhat P.V., De Luca L.M., Wind M.L. 1980 Reverse phase high-pressure liquid chromatography separation of retinoids, including retinylphosphate and mannosylretinylphosphate. *Anal Biochem.* **102** 243-248.

Bhat P.V., Jetten A.M. 1987 Metabolism of all-trans retinol and all-trans retinoic acid in rabbit tracheal epithelia cells in culture. *Biochim. Biophys. Acta* **922** 18-27.

Bhat P.V., Labrecque J., Boutin J.M., Lacroix A., Yoshida A. 1995 Cloning of a cDNA encoding rat aldehyde dehydrogenase with high activity for retinal oxidation. *Gene* **166** 303-306.

Bhat P.V., Lacroix A. 1986 Separation of geometric isomers of retinol and retinoic acid in non-aqueous high-performance liquid chromatography. In: *Methods in enzymology*. Éditeurs: Chytil F., McCormick D.B. Academic Press, Orlando, FL. 75-85.

Bhat P.V., Marcinkiewicz M., Li Y., Mader S. 1998b Changing patterns of renal retinal dehydrogenase expression parallel nephron development in the rat. *J. Histochem. Cytochem.* **46** (9) 1025-1032.

Bhat P.V., Poissant L., Falardeau P., Lacroix A. 1988a Enzymatic oxydation of all-trans retinal to retinoic acid in rat tissues. *Biochem Cell Biol.* **66** (7) 735-740.

Bhat P.V., Poissant L., Lacroix A. 1988b Properties of retinal-oxidizing enzyme activity in rat kidney. *Biochim. Biophys. Acta* **967** (2) 211-217.

Bhat P.V., Poissant L., Wang X.L. 1996 Purification and partial characterization of bovine kidney aldehyde dehydrogenase able to oxidize retinal to retinoic acid. *Biochem. Cell Biol.* **74** (5) 695-700.

Bhat P.V., Samaha H. 1999 Kinetic properties of the human liver cytosolic aldehyde dehydrogenase for retinal isomers. *Biochem. Pharmacol.* **57** 195-197.

Bhat P.V., Sundaresan P.R. 1988 High-performance liquid chromatography of vitamin A compounds. *CRC Critical Rev Anal. Chem.* **20** 197-219.

Blaner W.S. 2001 Cellular metabolism and actions of 13-cis-retinoic acid. *J. Am. Acad. Dermatol.* **45** S129-S135.

Blaner W.S., Olson J.A. 1994 Retinoid and retinoic acid metabolism. In: *The retinoids: Biology, Chemistry, and Medicine*. M.B. Sporn, A.B. Roberts, and D.S. Goodman, éditeurs. Raven Press Ltd, New York, 229-255.

Bloch C.E. 1919 Klinische untersuchungen über dystrophie und xerophthalmie bei jungen kindern. *Jahrb. Kinderheilk.* **89** 409-441.

Blomhoff R. 1994 Transport and metabolism of vitamin A. *Nutr. Rev.* **52** (2) S13-S23.

Brodeur H., Chagnon S., Parisotto M., Mader S., Bhat P.V. 2006 Kinetic properties of chimeric class I aldehyde dehydrogenases for retinal isomers. *Biochem. Cell Biol.* *in press*.

Brodeur H., Gagnon I., Mader S., Bhat P.V. 2003 Cloning of monkey RALDH1 and characterization of retinoid metabolism in monkey kidney proximal tubule cells. *J. Lipids Res.* **44** 303-313.

Calza L., Manfredi R., Chiodo F. 2003 Hyperlipidaemia in patients with HIV-1 infection receiving highly active antiretroviral therapy: epidemiology, pathogenesis, clinical course and management. *Int. J. Antimicrob. Agents* **22** (2) 89-99.

Chai X., Boermann M.H.E.M., Zhai Y., Napoli J.L. 1995 Cloning of a cDNA for liver microsomal retinol dehydrogenase: A tissue-specific, short-chain alcohol dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* **270** 3900-3904.

Chambon P. 1996 A decade of molecular biology of retinoic acid receptors. *FASEB J.* **10** 940-954.

Chomienne C., Fenaux P., Degos L. 1996 Retinoid differentiation therapy in promyelocytic leukemia. *FASEB J.* **10** 1025-1030.

Christina T., Hofmann C., Eichele E. 1993 9-cis retinoic acid, a potent inducer of digital pattern duplication in the chick wing bud. *Development* **118** 957-965.

Collins, M.D., Mao, G.E. 1999 Teratology of retinoids. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **39** 399-430.

Cullum M.E., Zile M.H. 1985 Metabolism of all-trans retinoic acid and all-trans retinyl acetate: demonstration of common physiological metabolites in rat small intestinal mucosa and circulation. *J. Biol. Chem* **260** 10590-10596.

Deitrich R.A. 1971 Genetic aspects of increase in rat liver aldehyde dehydrogenase induced by Phenobarbital. *Science* **173** (994) 334-336.

Deltour L., Foglio M.H. Duester G. 1999a Impaired retinol utilization in *Adh4* alcohol dehydrogenase mutant mice. *Dev. Genet.* **25** (1) 1-10.

Deltour L., Foglio M.H. Duester G. 1999b Metabolic deficiencies in alcohol dehydrogenase *Adh1*, *Adh3*, and *Adh4* null mutant mice. Overlapping roles for *Adh1* and *Adh4* in ethanol clearance and metabolism of retinol to retinoic acid. *J. Biol. Chem.* **274** (24) 16796-16801.

De Luca L.M. 1991 Retinoids and their receptors in differentiation, embryogenesis and neoplasia. *FASEB J.* **5** 2923-2933.

de Thé H., Lavau C., Marchio A., Chomienne C., Degos L., Dejean A. 1991 The PML-RAR alpha fusion mRNA generated by the t(15;17) translocation in acute promyelocytic leukemia encodes a functionally altered RAR. *Cell* **66** 675-684.

de Thé H., Marchio A., Thiollais P., Dejean A. 1989 Differential expression and ligand regulation of retinoic receptor α and β genes. *EMBO J.* **8** 429-433.

Dickinson F.M., Hart G.J. 1982 Effects of Mg^{2+} , Ca^{2+} and Mn^{2+} on sheep liver cytoplasmic aldehyde dehydrogenase. *Biochem J.* **205** 443-448.

Dickman E., Smith S.M. 1996 Selective regulation of cardiomyocyte gene expression and cardiac morphogenesis by retinoic acid. *Dev. Dyn.* **206** 39-48.

Disdier B., Marchetti M.N., Bun H., Placidi M., Durand A. 2000 Kinetics of plasma and tissue distribution of 9-cis retinoic acids in rats. *Skin Pharmacol. Appl. Skin Physiol.* **13** 9-16.

Driessen C.A.A., Winkens A.G., Kuhlmann H.J., Janssen A.P.M., Van Vugt A.H., Deutman A.F., Janssen J.J.M. 1998 The visual cycle retinal dehydrogenase: Possible involvement in the 9-cis retinoic acid biosynthetic pathway. *FEBS Lett.* **428** 135-.

Duester G. 1996 Involvement of alcohol dehydrogenases, short chain dehydrogenase/reductase, aldehyde dehydrogenase, and cytochrome P450 in the control of retinoid signaling by activation of retinoic acid synthesis. *Biochemistry* **24** 12221-12227.

Duester G. 2000 Families of retinoid dehydrogenases regulating vitamin A function: Production of visual pigment and retinoic acid. *Eur. J. Biochem.* **267** 4315-4324.

Duester G. 2001 Genetic dissection of retinoid dehydrogenases. *Chem.-Biol. Inter.* **130-132** 469-480.

Duester G., Mic F.A., Molotkov A. 2003 Cytosolic retinoid dehydrogenases govern ubiquitous metabolism of retinol to retinaldehyde followed by tissue-specific metabolism to retinoic acid. *Chem.-Biol. Inter.* **143-144** 201-210.

Dunn T.J., Koleske A.J., Lindahl R., Pitot H.C. 1989 Phenobarbital-inducible aldehyde dehydrogenase in the rat: cDNA sequence and regulation of the mRNA by Phenobarbital in responsive rats. *J. Biol. Chem.* **264** (22) 13057-13065.

Dupé V., Matt N., Garnier J.M., Chambon P., Mark M., Ghyselinck N.B. 2003 A newborn lethal defect due to inactivation of retinaldehyde dehydrogenase type 3 is prevented by maternal retinoic acid treatment. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100** (24) 14036-14041.

During, A., Nagao, A., Terao, J. 1998 β -carotene 15, 15'-dioxygenase activity and cellular retinal-binding protein type II level are enhanced by dietary unsaturated triacylglycerols in rat intestines. *J. Nutr.* **128** 1614-1619.

Eckhoff C., Nau H. 1990 Identification and quantification of all-*trans*- and 13-*cis*-retinoic acid and 13-*cis*-4-oxoretinoic acid in human plasma. *J. Lipid Res.* **31** 1445-1454.

Elizondo G., Corchero J., Sterneck E., Gozalez F.J. 2000 Feedback inhibition of the retinaldehyde gene ALDH1 by retinoic acid through retinoic acid receptor alpha and CCAAT/enhancer binding protein beta. *J. Biol. Chem.* **275** (50) 39747-39753.

Fan X., Molotkov A., Manabe S.I., Donmoyer C.M., Deltour L., Foglio M.H., Cuenca A.E., Blaner W.S., Lipton S.A., Duester G. 2003 Targeted disruption of *Aldh1a1* (*Raldh1*) provides evidence for a complex mechanism of retinoic acid synthesis in the developing retina. *Mol. Cell. Biol.* **23** (13) 4637-4648.

Filling C., Berndt K.D., Benach J., Knapp S., Prozorovski T., Nordling E., Landenstein R., Jornvall H., Opperman U. 2002 Critical residues for structure

and catalysis in short-chain dehydrogenases/reductases. *J. Biol. Chem.* **277** (28) 25677-25684.

Frota-Ruchon A., Marcinkiewicz M., Bhat P.V. 2000 Localization of retinal dehydrogenase type 1 in the stomach and intestine. *Cell Tissue Res.* **302** 397-400.

Fujii H., Sato T., Kaneko S., Gotoh O., Fujii-Kuriyama Y., Osawa K., Kato S., Hamada H. 1997 Metabolic inactivation of retinoic acid by a novel P450 differentially expressed in developing mouse embryos. *EMBO J.* **16** (14) 4163-4173.

Gagnon I., Duester G., Bhat P.V. 2002 Kinetic analysis of mouse retinal dehydrogenase type-2 (RALDH2) for retinal substrates. *Biochim. Biophys. Acta* **1596** 156-162.

Gagnon I., Duester G., Bhat P.V. 2003 Enzymatic characterization of recombinant mouse retinal dehydrogenase type 1. *Biochem. Pharmacol.* **65** 1685-1690.

Gamble M.V., Shang E., Zott R.P., Mertz J.R., Wolgemuth D.J., Blaner W.S. 1999 Biochemical properties, tissue expression, and gene structure of a short chain dehydrogenase/reductase able to catalyze cis-retinol oxidation. *J. Lipid Res.* **40** (12) 2279-2292.

Gestl, S.A., Green, M.D., Shearer, D.A., Fraenhoffer, E., Tephly, T.R., Weisz, J. 2002 Expression of UGT2B7, a UDP-glucuronosyltransferase implicated in the metabolism of 4-hydroxyesterone and all-*trans*-retinoic acid, in normal human breast parenchyma and in invasive and *in situ* breast cancer. *Am. J. Pathol.* **160** 1467-1479.

Ghyselinck, N.B., Bavik, C., Sapin, V., Mark, M., Bonnier, D., Hindelang, C., Dierich, A., Nilsson, C.B., Hankansson, H., Sauvant, P., Azaïs-Braesco, V., Frasson, M., Picaud, S., Chambon, P. 1999 Cellular retinol-binding protein I is essential for vitamin A homeostasis. *EMBO J.* **18** 4903-4914.

Giguère V., Ong E.S., Segui P., Evans R.M. 1987 Identification of a receptor for the morphogen retinoic acid. *Nature* **330** 615-617.

Giguère V. 1994 Retinoic acid receptors and cellular retinoid bonding proteins: Complex interplay in retinoid signalling. *Endoc. Rev.* **15** (1) 61-79.

Giguère V. 1999 Orphan nuclear receptors: from gene to function. *Endocr. Rev.* **20** (5) 689-725.

Godbout R., Monckton E.A. 2001 Differential regulation of the aldehyde dehydrogenase I gene in embryonic chick retina and liver. *J. Biol. Chem.* **276** (35) 32896-32904.

Gorry, P., Lufkin, T., Dierich, A., Rochette-Egly, C., Décimo, D., Dollé, P., Mark, M., Durand, B., Chambon, P. 1994 The cellular retinoic acid binding protein I is dispensable. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91** 9032-9036.

Gottardis M.M., Lamph W.W., Shalinsky D.R., Wellstein A., Heyman R.A. 1996 The efficacy of 9-cis retinoic acid in experimental models of cancer. *Breast Cancer Res Treat.* **38** (1) 85-96.

Gottesman, M.E., Quadro, L., Blaner, W.S. 2001 Studies of vitamin A metabolism in mouse model systems. *Bioessays* **23** 409-419.

Graham C.E., Brocklehurst K., Pickersgill R.W., Warren M.J. 2006 Characterization of retinaldehyde dehydrogenase 3. *Biochem. J.* **394** 67-75.

Grün F., Hirose Y., Kawauchi S., Ogura T., Umesono K. 2000 Aldehyde dehydrogenase 6, a cytosolic retinaldehyde dehydrogenase prominently expressed in sensory neuroepithelia during development. *J. Biol. Chem.* **275** 41210-41218.

Gu X., Xu F., Wang X., Gao X., Zhao Q. 2005 Molecular cloning and expression of a novel CYP26 gene (*cyp26d1*) during zebrafish early development. *Gene Expr. Patterns* **5** (6) 733-739.

Gudas L.J., Sporn M.B., Roberts A.B. 1994 Cellular biology and chemistry of the retinoids. In: *The retinoids: Biology, Chemistry, and Medicine*. Éditeurs: Sporn M.B., Roberts A.B., Goodman D.S. Raven Press, New York. 443-520.

Guimond J., Devost D., Brodeur H., Mader S., Bhat P.V. 2002 Characterization of the rat RALDH1 promoter. A functional CCAAT and octamer motif are critical for basal promoter activity. *Biochim. Biophys. Acta* **1579** (2-3) 81-91.

Haeseleer F., Huang J., Lebioda L., Saari J.C., Palczewski K. 1998 Molecular characterization of a novel short-chain dehydrogenase/reductase that reduces all-trans-retinal. *J. Biol. Chem.* **273** (34) 21790-21799.

Haselbeck R.J., Ines H., Duester G. 1999 Distinct functions for Aldh1 and Raldh2 in the control of ligand production for embryonic retinoid signaling pathways. *Dev. Genet.* **25** 353-364.

Hebuterne X., Wang X.D., Johnson E.J., Krinsky N.L., Russell R.M. 1995 Intestinal absorption and metabolism of 9-cis-beta-carotene in vivo: Biosynthesis of 9-cis retinoic acid. *J. Lipid Res.* **36** 1264-1273.

Heyman R.A., Mangelsdorf D.J., Dyck J.A., Stein R.B., Eichele G., Evans R.M., Thaller C. 1992 9-cis retinoic acid is a high affinity ligand for the retinoid X receptor. *Cell* **68** 397-406.

Ho K.K., Allali-Hassani A., Hurley T.D., Weiner H. 2005 Differential effects of Mg^{2+} ions on the individual kinetic steps of human cytosolic and mitochondrial aldehyde dehydrogenases. *Biochemistry* **44** 8022-8029.

Hofmann C., Eichele G. 1994 Retinoids in development. In: The retinoids: Biology, Chemistry, and Medicine. Éditeurs: Sporn M.B., Roberts A.B., Goodman D.S. Raven Press, New York. 44319-350.

Horton C., Maden M. 1995 Endogenous distribution of retinoids during normal development and teratogenesis in mouse embryo. *Dev Dyn.* **202** 312-323.

Hsu L.C., Chang W.C., Hiraoka L., Hsien C.L. 1994 Molecular cloning, genomic organization, and chromosomal localization of an additional human aldehyde dehydrogenase gene, ALDH6. *Genomics* **24** (2) 333-341.

Hsu L.C., Chang W.C., Hoffman I., Duester G. 1999 Molecular analysis of two closely related mouse aldehyde dehydrogenase genes: identification of a role for *Aldh1*, but not *Aldh1-pb*, in the biosynthesis of retinoic acid. *Biochem J.* **339** 387-395.

Hsu L.C., Chang W.C., Yoshida A. 2000 Mouse type-2 retinaldehyde dehydrogenase (RALDH2) : genomic organization, tissue-dependent expression, chromosome assignment and comparison to other types. *Biochim. Biophys. Acta* **1492** 289-293.

Hsu L.C., Tani K., Fujiyoshi T., Kurachi K., Yoshida A. 1985 Cloning of cDNAs for human aldehyde dehydrogenases 1 and 2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **82** (11) 3771-3775.

Imaoka S., Wan J., Chow T., Hiroi T., Eyanagi R., Shigematsu H., Funae Y. 1998 Cloning and characterization of the CYP2D1-binding protein, retinal dehydrogenase. *Arch. Biochem. Biophys.* **353** (2) 331-336.

Ikawa , Impraim C.C., Wang G., Yoshida A. 1983 Isolation and characterization of aldehyde dehydrogenase isozymes from usual and atypical human livers. *J. Biol. Chem.* **258** (10) 6282-6287.

Issa J.P. 2005 Optimizing therapy with methylation inhibitors in myelodysplastic syndrome: dose, duration, and patient selection. *Nat. Clin. Pratc. Oncol.* **Suppl.** **1** S24-S29.

Isse T., Oyama T., Kitagawa K., Matsuno K., Matsumoto A., Yoshida A., Nakayama K., Nakayama K., Kawamoto T. 2002 Diminished alcohol preference in transgenic mice lacking aldehyde dehydrogenase activity. *Pharmacol.* **12** 621-626.

Ito Y.L., Zile M., Ahrens M., De Luca H.F. 1978 Liquid-gel partition chromatography of vitamin A compounds in biological samples: formation of retinoic acid from retinyl acetate. *J. Lipid Res.* **15** 517-521.

Jordan M., Schallhorn A., Wurm F.M. 1996 Transfecting mammalian cells: Optimization of critical parameters affecting calcium-phosphate precipitation formation. *Nucleic Acids Res.* **24** 596-601.

Kakizuka A., Miller W.H., Umesono K., Warrell R., Frankel S., Dmitrovsky E., Evans R. 1991 Chromosomal translocation t(15;17) in human acute promyelocytic leukemia fuses RAR alpha with a novel putative transcription factor, PML. *Cell* **66** 663-674.

Karrer P., Morf R., Schöpp K. 1931 Zur kenntnis des vitamins-A aus frischtranen. *Helv. Chim. Acta* **14** 1431-1436.

Kastner P., Grondona J.M., Gansmuller A., LeMeur M., Décimo D., Vonesch J.L., Dollé P., Chambon P. 1994 Genetic analysis of RXR alpha developmental function : convergence of RXR and RAR signaling pathways in heart and eye morphogenesis. *Cell* **78** (6) 987-1003.

Kastner P., Krust A., Mendelsohn C., Garnier J.M., Zelent A., Leroy P., Staub A., Chambon P. 1990 Murine isoforms of retinoic acid receptor γ with specific patterns of expression. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **87** 2700-2704.

Kathmann E.C., Lipsky J.J. 1997 Cloning of a cDNA encoding a constitutively expressed rat liver cytosolic aldehyde dehydrogenase. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **236** (2) 527-531.

Kathmann E.C., Naylor S., Lipsky J.J. 2000 Rat liver constitutive and Phenobarbital-inducible aldehyde dehydrogenase are highly homologous proteins that function as distinct isozymes. *Biochemistry* **39** (36) 1170-1176.

Kersten S., Dong D., Lee W., Reczek P.R., Noy N. 1998 Auto-silencing by the retinoid X receptor. *J. Mol. Biol.* **284** (1) 21-32.

Kersten S., Gronemeyer H., Noy N. 1997 The DNA binding pattern of the retinoid X receptor is regulated by ligand-dependent modulation of its oligomeric state. *J. Biol. Chem.* **272** (19) 12771-12777.

Kersten S., Kellerher D., Chambon P., Gronemeyer H., Noy N. 1995a Retinoid X receptor alpha forms tetramers in solution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92** (19) 8645-8649.

Kersten S., Pan L., Chambon P., Gronemeyer H., Noy N. 1995b Role of ligand in retinoid signaling. 9cis-retinoic acid modulates the oligomeric state of the retinoid X receptor. *Biochemistry* **34** (42) 13717-13721.

Kersten S., Pan L., Noy N. 1995c On the role of ligand in retinoid signaling: positive cooperativity in the interactions of 9-cis retinoic acid with tetramers of the retinoid X receptor. *Biochemistry* **34** (43) 14263-14269.

Kim H., Lapointe J., Kaygusuz G., Ong D.E., Li C., van de Rijn M., Brooks J.D., Pollack J.R. 2005 The retinoic acid synthesis gene *ALDH1a2* is a candidate tumor suppressor in prostate cancer. *Cancer Res.* **65** 8118-8124.

Kojima R., Fujimore T., Kiyota N., Toriya Y., Fukuda T., Ohashi T., Sato T., Yoshizawa Y., Takeyama K.I., Mano H., Masushige S., Kato S. 1994 In vivo isomerization of retinoic acids: rapid isomer exchange and gene expression. *J. Biol. Chem.* **269** 32700-32707.

Kraft J.C., Kimelman D., Juchau M.R. 1995 *Xenopus laevis*: a model system for the study of embryonic retinoid metabolism. I. Embryonic metabolism of 9-cis- and all-trans retinals and retinols to their corresponding acid forms. *Drug Metab. Dispos.* **23** 72-82.

Krezel W., Dupé V., Mark M., Dierich A., Kastner P., Chambon P. 1996 RXR gamma null mice are apparently normal and compound RXRalpha+/-/RXRbeta-/-/RXRgamma-/- mutant mice are viable. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93** 9010-9014.

Labrecque J., Bhat, P.V., Lacroix, A. 1997 Régulation de la synthèse des acides rétinoïques tout-*trans* et 9-*cis* : rôle d'une nouvelle rétinal déshydrogénase. *Médecine/Sciences* **13** 345-352.

Labrecque J., Dumas, F., Lacroix A. Bhat P.V. 1995 A novel isoenzyme of aldehyde dehydrogenase specifically involved in the biosynthesis of 9-cis and all-trans retinoic acid. *Biochem. J.* **305** 681-684.

Labrecque J., Bhat PV., Lacroix A. 1993 Purification and partial characterization of a rat kidney aldehyde dehydrogenase that oxidizes retinal to retinoic acid. *Biochem. Cell Biol.* **71** 85-89.

Lampron, C., Rochette-Egly, C., Gorry, P., Dollé, P., Mark, M., Lufkin, T., LeMeur, M., Chambon, P. 1995 Mice deficient in cellular retinoic acid binding

protein II (CRABPII) or in both CRABPI and CRABPII are essentially normal. *Development* **121** 539-548.

Lane M.A., Bailey S.J. 2005 Role of retinoid signalling in the adult brain. *Prog. Neurobiol.* **75** (4) 275-293

Lansink M., Van Bennekum A.M., Blaner W.S., Kooistra T. 1997 Differences in metabolism and isomerization of all-trans retinoic acid and 9-cis retinoic acid between human endothelial cells and hepatocytes. *Eur. J. Biochem.* **247** 596-604.

Lanvers C., Hempel G., Blaschke G., Boos J. Chemically induced isomerization and differential uptake modulate retinoic acid disposition in HL-60 cells. *FASEB J.* **12** 1627-1633.

Larson R.A., Kondo K., Vardiman J.W., Butler A.R.E., Golomb H.M., Rowley J.D. 1984 Evidence for a 15;17 translocation in every patient with acute promyelocytic leukemia. *Am. J. Med.* **76** 827-841.

Lengfelder E., Saussele S., Weisser A., Büchner T., Hehlmann R. 2005 Treatment concepts of acute promyelocytic leukemia. *Clin. Rev. Onco. Hemato.* **56** 261-274.

Levin A.A., Sturzenbecker L.J., Kazmer S., Bosakowski T., Huselton C., Allenby G., Speck J., Kratzeisen C., Rosenberger M., Lovey A., Grippo J.F. 1992 9-cis retinoic acid stereoisomer binds and activates the nuclear receptor RXRa. *Nature* **355** 359-361.

Li H., Wagner E., McCaffery P., Smith D., Andreadis A., Drager U.C. 2000 A retinoic acid synthesizing enzyme in ventral retina and telencephalon of the embryonic mouse. *Mech. Dev.* **95** (1-2) 283-289.

Lidén M., Eriksson U. 2005 Development of a versatile reporter assay for studies of retinol uptake and metabolism in vivo. *Exp. Cell Res.* **310** 401-408.

Lidén M., Tryggvason K., Eriksson U. 2003 Structure and function of retinol dehydrogenase of the short chain dehydrogenase/reductase family. *Mol. Asp. Med.* **24** 403-409.

Lin M., Napoli J.L. 2000 cDNA cloning and expression of a human aldehyde dehydrogenase (ALDH) active with 9-cis-retinal and identification of a rat ortholog ALDH12. *J. Biol. Chem* **275** (51) 40106-40112.

Lin M., Zhang M., Abraham M., Smith S.M., Napoli J.L. 2003 Mouse retinal dehydrogenase 4 (RALDH4), molecular cloning, cellular expression, and activity

in 9-*cis*-retinoic acid biosynthesis in intact cells. *J. Biol. Chem.* **278** (11) 9856-9861.

Liu W., Hellman P., Li Q., Yu W-R., Juhlin C., Nordlinder H., Rollman O., Akerstrom G., Törmä H., Melhus H. 1996 Biosynthesis and function of all-*trans*- and 9-*cis*-retinoic acid in parathyroid cell. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **229** 922-929.

Lohnes D., Mark M., Mendelsohn C., Dollé P., Dierich A., Gorry P., Gansmuller A., Chambon P. 1994 Function of the retinoic acid receptor (RARs) during development (I) Craniofacial and skeletal abnormalities in double RAR mutants. *Development* **120** 2723-2748.

Lotan R. 1996 retinoids in cancer chemoprevention. *FASEB J.* **10** 1031-1039.

MacLean G., Abu-Abed S., Dollé P., Tahayato A., Chambon P., Petkovich M. 2001 Cloning of a novel retinoic-acid metabolising cytochrome P450, Cyp26B1, and comparative expression analysis with Cyp26A1 during early murine development. *Mech. Dev.* **107** (1-2) 195-201.

Mangelsdorf D.J. 1994 Vitamin A receptors. *Nutr. Rev.* **52** (2) S32-S44.

Mangelsdorf D.J., Ong E.S., Dyck J.A., Evans R.R. 1990 Nuclear receptor that identifies a novel retinoic acid response pathway. *Nature* **345** 224-229.

Mangelsdorf D., Umesono J.K., Evans R.M. 1994 The retinoid receptors. In: *The retinoids: Biology, Chemistry, and Medicine.* M.B. Sporn, A.B. Roberts, and D.S. Goodman, éditeurs. Raven Press Ltd, New York, 319-349.

Manthey C.L., Landkamer G.J., Sladek N.E. 1990 Identification of the mouse aldehyde dehydrogenases important in aldophosphamide detoxification. *Cancer Res.* **50** 4991-5002.

Mark M., Ghyselinck N.B., Chambon P. 2006 Function of retinoid nuclear receptors: lessons from genetic and pharmacological dissections of the retinoic acid signalling pathway during mouse embryogenesis. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **46** 451-480.

Mark M., Ghyselinck N.B., Wendling O., Dupé V., Mascres B., Kastner P., Chambon P. 1999 A genetic dissection of the retinoid signaling pathway in the mouse. *Proc. Nutr. Soc.* **58** 609-613.

McCaffery P., Posch K.C., Napoli J.L., Gudas, L., Dräger U.C. 1993 Changing patterns of the retinoic acid system in the developing retina. *Dev. Biol.* **158** 390-399.

McCollum E.V., Davis M. 1913 The necessity of certain lipids in the diet during growth. *J. Biol. Chem.* **15** 167-175.

McCullough F.S.W., Northrop-Clewes C.A., Thurnham D.I. 1999 The effect of vitamin A on epithelial integrity. *Proc. Nutr. Soc.* **58** 289-293.

McLaren D.S., Frigg M. Manuel sight and life sur le troubles dus à la carence en vitamine A. 2002.

Melnick A., Licht J.D. 1999 Deconstructing a disease: RAR α , its fusion partners, and their roles in the pathogenesis of acute promyelocytic leukemia. *Blood* **93** (10) 3167-3215.

Mertz J.R., Shang E., Piantadosi R., Wei S., Wolgemuth D.J., Blaner W.S. 1997 Identification and characterization of a stereospecific human enzyme that catalyzes 9-cis retinal oxidation. *J. Biol. Chem.* **272** 33125-33131.

Mic F.A., Haselbeck R.J., Cuenca A.E., Duester G. 2002 Novel retinoic acid generating activities in the neural tube and heart identified by conditional rescue of *Raldh2* null mutant mice. *Development* **129** 2271-2282.

Mic F.A., Molotkov A., Benbrook D.M., Duester G. 2003 Retinoid activation of retinoic acid receptor but not retinoid X receptor is sufficient to rescue lethal defect in retinoic acid synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100** (12) 7135-7140.

Mic F.A., Molotkov A., Fan X., Cuenca A.E., Duester G. 2000 RALDH3, a retinaldehyde dehydrogenase that generates retinoic acid is expressed in the ventral retinal, otic vesicle and olfactory pit during mouse development. *Mech. Dev.* **97** (1-2) 227-230.

Mira-y-Lopez R., Zheng W.L., Kuppumbatti Y.S., Rexer B., Jing Y., Ong D.E. 2000 Retinol conversion to retinoic acid is impaired in breast cancer cell lines relative to normal cells. *J. Cell Physiol.* **185** 302-309.

Molotkov A., Duester G. 2003 Genetic evidence that retinaldehyde dehydrogenase *Raldh1* (*Aldh1a1*) functions downstream of alcohol dehydrogenase *Adh1* in metabolism of retinol to retinoic acid. *J. Biol. Chem.* **278** (38) 36085-36090.

Molotkov A., Deltour L., Foglio M.H., Cuenca A.E., Duester G. 2002a Distinct retinoid metabolic functions for alcohol dehydrogenase genes *Adh1* and *Adh4* in protection against vitamin A toxicity or deficiency revealed in double null mutant mice. *J. Biol. Chem.* **277** (16) 13804-13811.

Molotkov A., Fan X., Deltour L., Foglio M.H., Martras S., Farrés J., Parés X., Duester G. 2002b Stimulation of retinoic acid production and growth by ubiquitously expressed alcohol dehydrogenase *Adh3*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **99** (8) 5337-5342.

Montplaisir V., Chow Lan N., Guimond J., Savineau C., Bhat P.V., Mader S. 2002 Recombinant class I aldehyde dehydrogenases specific for all-*trans*- or 9-*cis*-retinal. *J. Biol. Chem.* **277** (20) 17486-17492.

Momparler R.L. 2005 Epigenetic therapy of cancer with 5-aza-2'-deoxycytidine (decitabine). *Semin Oncol.* **32** (5) 443-451.

Moore S.A., Baker H.M., Blythe T.J., Kitson K.E., Kitson T.M., Baker E.N. 1998 Sheep liver cytosolic aldehyde dehydrogenase: the structure reveals the basis for the retinal specificity of class 1 aldehyde dehydrogenases. *Structure* **6** 1541-1551.

Moore S.A., Baker H.M., Blythe T.J., Kitson K.E., Kitson T.M., Baker E.N. 1999 A structural explanation for the retinal specificity of class 1 ALDH enzymes. In: *Enzymology and molecular biology of carbonyl metabolism 7*. Weiner et coll., éditeurs. Plenum publishers, New York. 27-38.

Moore T. 1957 *Vitamin A* Elsevier, Amsterdam.

Nagao A., Olson J.A. 1994 Enzymatic formation of 9-*cis*, 13-*cis*, and all-*trans* retinals from isomers of b-carotene. *FASEB J.* **8** 968-973.

Napoli, J.L. 1996 Biochemical pathways of retinoid transport, metabolism, and signal transduction. *Clin. Immuno. Immunopatho.* **80** s52-s62.

Napoli J.L. 2000 Retinoic acid: its biosynthesis and metabolism. *Prog. Nucleic Acid Res.* **63** 139-188.

Nathans J. 1990 Determinants of visual pigment absorbance: identification of the retinylidene Schiff's base counterion in bovine rhodopsin. *Biochemistry* **29** 9746-9752.

Nau H. 2001 Teratogenicity of isotretinoin revisited : species variations and the role of all-*trans*-retinoic acid. *J. Am. Acad. Dermatol.* **45** S183-S187.

Nelson D.R. 1999 A second CYP26 P450 in humans and zebrafish: CYP26B1. *Arch. Biochem. Biophys.* **371** (2) 345-347.

Niederreither K., Abu-Abed S., Schuhbauer B., Petkovich M., Chambon P., Dollé P. 2002 Genetic evidence that oxidative derivatives of retinoic acid are not

involved in retinoid signalling during mouse development. *Nature Genetics* **31** 84-88.

Niederreither K., Fraulob V., Garnier J.M., Chambon P., Dollé P. 2002b Differential expression of retinoic acid-synthesizing (RALDH) enzymes during fetal development and differentiation in the mouse. *Mech. Dev.* **110** 165-171.

Niederreither K., McCaffery P., Drager U.C., Chambon P., Dollé P. 1997 restricted expression and retinoic acid-induced down regulation of the retinaldehyde dehydrogenase type 2 (RALDH2) gene during mouse development. *Mech. Dev.* **62** (1) 67-78.

Niederreither K., Subbarayan V., Dollé P., Chambon P. 1999 Embryonic retinoic acid synthesis is essential for early mouse post-implantation development. *Nature* **21** 444-448.

Niederreither K., Vermot J., Fraulob V., Chambon P., Dollé P. 2002c Retinaldehyde dehydrogenase 2 (RALDH2)-independent patterns of retinoic acid synthesis in the mouse embryo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99** (25) 16111-16116.

Niederreither K., Vermot J., LeRoux I., Schuhbaur B., Chambon P., Dollé P. 2003 The regional pattern of retinoic acid synthesis by RALDH2 is essential for the development of posterior pharyngeal arches and the enteric nervous system. *Development* **130** (11) 2525-2534.

Niederreither K., Vermot J., Messaddeq N., Schuhbaur B., Chambon P., Dollé P. 2001 Embryonic retinoic acid synthesis is essential for heart morphogenesis in the mouse. *Development* **128** 1019-1031.

Niederreither K., Vermot J., Schunhbaaur B., Chambon P., Dollé P. 2000 Retinoic acid synthesis and hindbrain patterning in the mouse embryo. *Development* **127** 75-85.

Noji S., Yamaai T., Koyama E., Nohno T., Taniguichi S. 1989a Spatial and temporal expression pattern of retinoic acid receptor genes during mouse bone development. *FEBS Lett.* **257** 93-96.

Noji S., Yamaai E., Nohno T., Fujimoto W., Arata J., Taniguichi S. 1989b Expression of retinoic acid receptor genes in keratinising front skin. *FEBS Lett.* **59** 86-90.

Noy N. 2000 Retinoid-binding proteins: mediators of retinoid action. *Biochem. J.* **348** 481-495.

Olson J.A. 1964 The biosynthesis and metabolism of carotenoids and retinal (vitamin A). *J. Lipid Res.* **5** 281-299.

Ong, D.E., Newcomer, M.E., Chytil, F. 1994 Cellular retinoid-binding proteins. In: *The retinoids, Biology, Chemistry and Medicine*. Sporn, Robert, Goodman eds, 2nd edition, NY, Raven Press, pp. 283-312.

Opperman U., Filling C., Hult M., Shafqat N., Wu X., Lindh M., Shafqat J., Nordling E., Kallberg Y., Persson B., Jörnvall H. 2003 Short-chain dehydrogenases/reductases (SDR): the 2002 update. *Chem.-Biol. Inter.* **143-144** 247-253.

Opperman U.C.T., Filling C., Jörnvall H. 2001 Forms and functions of human SDR enzymes. *Chem.-Biol. Inter.* **130-132** 699-705.

Osmond M.K., Butler A.J., Voon F.C.T., Bellairs R. 1991 The effects of retinoic acid on heart formation in the early chick embryo. *Development* **113** 1405-1417.

Paik J., Blaner W.S., Swisshelm K. 2005 Cis-retinol dehydrogenase: 9-cis retinol metabolism and its effect on proliferation of human MCF-7 breast cancer cells. *Exp. Cell Res.* **303** 183-196.

Paik J., Vogel S., Piantedosi R., Sykes A., Blaner W.S., Swisshelm K. 2000 9-cis-retinoids: biosynthesis of 9-cis-retinoic acid. *Biochemistry* **39** (27) 8073-8084.

Palha J.A., Goodman A.B. 2005 Thyroid hormones and retinoids: A possible link between genes and environment in schizophrenia. *Brain Res. Brain Res. Rev.* Epub.

Penzes P., Wang X., Sperkova Z., Napoli J.L. 1997 Cloning of rat cDNA encoding retinal dehydrogenase isozyme type 1 and its expression in *E. coli*. *Gene* **191** (2) 167-172.

Perozich J., Nicholas H., Lindahl R., Hempel J. 1999 The big book of aldehyde dehydrogenase sequences: An overview of the extended family. *Enzymology and molecular biology of carbonyl metabolism* **7** 1-7.

Perozich, J., Nicholas H., Wang B.C., Lindahl R., Hempel J. 1999b Relationship within the aldehyde dehydrogenase extended family. *Protein Science* **8** 137-146.

Petkovich M., Brand N.J., Krust A., Chambon P. 1987 A human retinoic acid receptor which belongs to the family of nuclear receptors. *Nature* **330** 444-450.

Quadro, L., Blaner, W.S., Salchow, D.J., Vogel, S., Piantedosi, R., Gouras, P., Freeman, S., Cosma, M.P., Colantuoni, V. Gottesman, M.E. 1999 Impaired

retinal function and vitamin A availability in mice lacking retinol-binding protein. *EMBO J.* **18** 4633-4644.

Raghunathan L., Hsu L.C., Klisak I., Sparkes R.S., Yoshida A., Mohandas T. 1988 Regional localization of the human genes for aldehyde dehydrogenase-1 and aldehyde dehydrogenase-2. *Genomics* **2** (3) 267-269.

Rastinejad F. 2001 Retinoid X receptor and its partners in the nuclear receptor family. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **11** 33-38.

Rastinejad F., Wagner T., Zhao Q., Khorasanizadeh S. 2000 Structure of the RXR-RAR DNA-binding complex on the retinoic acid response element DR1. *EMBO J.* **19** (5) 1045-1054.

Ray W.J., Bain G., Yao M., Gottlieb D.I. 1997 CYP26, a novel mammalian cytochrome P450, is induced by retinoic acid and defines a new family. *J. Biol. Chem.* **272** (30) 18702-18708.

Reijntjes S., Gale E., Maden M. 2004 Generating gradients of retinoic acid in the chick embryo: *Cyp26C1* expression and a comparative analysis of the Cyp26 enzymes. *Dev. Dyn.* **230** 509-517.

Rexer B.N., Zheng W.L., Ong D.E. 2001 Retinoic acid biosynthesis by normal human breast epithelium is via aldehyde dehydrogenase 6, absent in MCF-7 cells. *Cancer Res.* **61** 7065-7070.

Romand R., Albuissou E., Niederreither K., Fraulob V., Chambon P., Dollé P. 2001 Specific expression of the retinoic acid-synthesizing enzyme RALDH2 during mouse inner ear development. *Mech. Devel.* **106** 185-189.

Romand R., Niederreither K., Abu-Abed S., Petkovich M., Fraulob V., Hashino E., Dollé P. 2004 Complementary expression patterns of retinoic acid-synthesizing and -metabolizing enzymes in pre-natal mouse inner ear structures. *Gene Express. Patt.* **4** 123-133.

Rongneparut P., Weaver S. 1991 Isolation and characterization of a cytosolic aldehyde dehydrogenase encoding cDNA from mouse liver. *Gene* **101** (2) 261-265.

Rosenthal D., Lancillotti F., Darwiche N., Sinha R., De Luca L.M. 1994 Regulation of epithelial differentiation by retinoids. In: *Retinoids*. Éditeur: Blomhoff R. M. Decker, New York 425-450.

Ross A.C., Hammerling U. 1994 Retinoids and the immune system. In: *The retinoids: Biology, Chemistry, and Medicine*. Éditeurs: Sporn M.B., Roberts A.B., Goodman D.S. Raven Press, New York. 521-544.

Ross S.A., McCaffrey P.J., Drager U.C., DeLuca L.M. 2000 Retinoids in embryonal development. *Physiol. Rev.* **80** (3) 1021-1054.

Rowe A. 1997 Retinoid X receptors. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **29** 275-278.

Saari J.C. 1994 Retinoids in photosensitive systems. In: *The retinoids: Biology, Chemistry, and Medicine*. Éditeurs: Sporn M.B., Roberts A.B., Goodman D.S. Raven Press, New York. 351-386.

Saari J.C. 1999 Retinoids in mammalian vision. In: *The retinoid in mammalian vision*. Éditeurs: Nau H., Blaner W.S. Springer, Heidelberg 563-610.

Sakai Y., Meno C., Fujii H., Nishino J., Shiratori H., Saijoh Y., Rossant J., Hamada H. 2001 The retinoic acid-inactivating enzyme CYP26 is essential for establishing an uneven distribution of retinoic acid along the antero-posterior axis within the mouse embryo. *Genes Dev.* **15** (2) 213-225.

Sass J.O., Tzimas G., Mohamed M.A.E., Nau H. 1999 Metabolism of retinaldehyde isomers in pregnant rats: 13-*cis* and all-*trans*-retinaldehyde, but not 9-*cis* retinaldehyde, yield very similar patterns of retinoid metabolites. *Drug Metab. Dispos.* **27** 317-321.

Seeliger M.W., Biesalski H.K., Wissinger B., Gollnick H., Gielen S., Frank J., Beck S., Zrenner E. 1999 Phenotype in retinol deficiency due to a hereditary defect in retinol binding protein synthesis. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **40** (1) 3-11.

Shulman A.I., Mangelsdorf D.J. 2005 Retinoid X receptor heterodimers in the metabolic syndrome. *N. Engl. J. Med.* **353** 604-615.

Sophos N.A., Vasiliou V. 2003 Aldehyde dehydrogenase gene superfamily : the 2002 update. *Chemico-Biological Interactions* **143-144** 5-22.

Sporn M.B., Roberts A.B., Goodman D.S. 1984 Introduction. In: *The retinoids: Biology, Chemistry, and Medicine*. Éditeurs: Sporn M.B., Roberts A.B., Goodman D.S. Raven Press, New York. 1-5.

Staels B. 2001 Regulation of lipid and lipoprotein metabolism by retinoids. *J. Am. Acad. Dermatol.* **45** S158-S167.

Stephensen C.B. 2001 Vitamin A, infection, and immune function. *Ann. Rev. Nutr.* **21** 167-192.

Strausberg R. 2000 Homo sapiens aldehyde dehydrogenase 1 family, member A1 (ALDH1A1) mRNA. GenBank accession no. gi: 4502030.

Strickland S., Sawey M.J. 1980 Studies on the effect of retinoids on the differentiation of teratocarcinoma stem cells in vitro and in vivo. *Dev. Biol.* **78** 76-85.

Sundaresan P.R., Bhat P.V. 1982 Ion-pair high-pressure liquid chromatography of cis-trans isomers of retinoic acid in tissues of vitamin A sufficient rats. *J. Lipid Res.* **23** 448-455.

Tahayato A., Dollé P., Petkovich M. 2003 Cyp26C1 encodes a novel retinoic acid-metabolizing enzyme expressed in the hindbrain, inner ear, first branchial arch and tooth buds during murine development. *Gene Expr. Patterns* **3** (4) 449-454.

Taimi M., Helvig C., Wisniewski J., Ramshaw H., White J., Amad M., Korczak B., Petkovich M. 2004 A novel human cytochrome P450, CYP26C1, involved in metabolism of 9-cis and all-trans isomers of retinoic acid. *J. Biol. Chem.* **279** (1) 77-85.

Thompson J.N., Howell J.McC., Pitt G.A.J. 1964 Vitamin A and reproduction in rats. *Proc. Royal Soc.* **159** 510-535.

Toma E., Devost D., Chow Lan N., Bhat P.V. 2001 HIV-protease inhibitors alter retinoic acid synthesis. *AIDS* **15** (15) 1979-1984.

Tryggvason K., Romert A., Eriksson U. 2001 Biosynthesis of 9-*cis* retinoic acid; the roles of different retinal dehydrogenases and a structure-activity analysis of microsomal retinal dehydrogenases. *J. Biol. Chem.* **276** 19253-19258.

Ulven S.M., Gundersen T.E., Sakhi A.K., Glover J.V., Blomhoff R. 2001 Quantitative axial profiles of retinoic acid in the embryonic mouse spinal cord. *Dev. Dyn.* **222** 341-353.

Ulven S.M., Gundersen T.E., Weedon M.S., Landaas V.O., Sakhi A.K., Fromm S.H., Geronimo B.A., Moskaug J.O., Blomhoff R. 2000 Identification of endogenous retinoids, enzymes, binding proteins, and receptors during early postimplantation development in mouse: important role of retinal dehydrogenase type 2 in synthesis of all-trans-retinoic acid. *Dev. Biol.* **220** 379-391.

Umesono K., Murakami K.K., Thompson C.C., Evans R.M. 1991 Direct repeats as selective response elements for the thyroid hormone, retinoic acid, and vitamin D3 receptors. *Cell* **65** 1255-1266.

Urbach J., Rando R.R. 1994a Isomerization of all-trans retinoic acid to 9-cis retinoic acid. *Biochem. J.* **299** 459-465.

Urbach J., Rando R.R. 1994b Thiol dependent isomerization of all-trans-retinoic acid to 9-cis-retinoic acid. *FEBS lett.* **351** (3) 429-432.

Urnov F.D., Miller J.C., Lee Y.L., Beauséjour C.M., Rock J.M., Augustus S., Jamieson A.C., Porteus M.H., Gregory P.D., Holmes M.C. 2005 Highly efficient endogenous human gene correction using designed zinc-finger nucleases. *Nature* **435** (7042) 646-651.

Vasiliou V., Pappa A., Petersen D.R. 2000 Role of aldehyde dehydrogenase in endogenous and xenobiotic metabolism. *Chem. Biol. Interact.* **129** 1-19.

Vasiliou V., Nerbert D.W. 2005 Analysis and update of the human aldehyde dehydrogenase (ALDH) gene family. *Human Genomics* **2** (2) 138-143.

Vasiliou V., Bairoch A., Tipton K.F. Nerbert D.W. 1999 Eukaryotic aldehyde dehydrogenase (ALDH) genes: human polymorphisms, and recommended nomenclature based on divergent evolution and chromosomal mapping. *Pharmacogenetics* **9** 421-434.

Veech R.L., Egglestone L.V., Krebs H.A. 1969 The redox state of free nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate in the cytoplasm of rat liver. *Biochem. J.* **115** (4) 609-619.

Vermot J., Llamas J.G., Fraulob V., Nederrreither K., Chmabon P., Dollé P. 2005 Retinoic acid controls the bilateral symmetry of somite formation in the mouse embryo. *Science* **308** 563-566.

Villamor E., Fawzi W.W. 2005 Effects of vitamin A supplementation on immune response and correlation with clinical outcomes. *Clin. Microbiol. Rev.* **18** (3) 446-464.

Viviano C.M., Horton C.E., Maden M., Brocks J.P. 1995 Synthesis and release of 9-cis retinoic acid by the urodele wound epidermis. *Development* **121** 3753-3762.

Wang X.D., Krinsky N.I., Benotti P.N., Russell R.M. 1994 Biosynthesis of 9-cis-retinoic acid from 9-cis- β -carotene in human intestinal mucosa *in vitro*. *Arch. Biochem. Biophys.* **313** (1) 150-155.

Wang X., Penzes P., Napoli J.L. 1996 Cloning of a cDNA encoding an aldehyde dehydrogenase and its expression in *Escherichia coli*. Recognition of retinal as substrate. *J. Biol. Chem.* **271** (27) 16288-16293.

Wang Y., Zolfaghari R., Ross C.A. 2002 Cloning of rat cytochrome P450RAI (CYP26) cDNA and regulation of its gene expression by all-trans-retinoic acid *in vivo*. *Arch. Biochem. Biophys.* **401** (2) 235-243.

Wei, S., Episkopou, V., Piantedosi, R., Maeda, S., Shimada, K., Gottesman, M.E., Blaner, W.S. (1995) Studies on the metabolism of retinol and retinol-binding protein in transthyretin-deficient mice produced by homologous recombination. *J. Biol. Chem.* **270** 866-870.

Wellik D.M., DeLuca H.F. 1995 Retinol in addition to retinoic acid is required for successful gestation in vitamin A-deficient rats. *Biol. Reprod.* **53** 1392-1397.

Weng, W., Li, L., van Bennekum, A.M., Potter, S.H., Harrison, E.H., Blaner, W.S., Breslow, J.L., Fisher, E.A. 1999 Intestinal absorption of dietary cholesteryl ester is decreased but retinyl ester absorption is normal in carboxyl ester lipase knockout mice. *Biochemistry* **38** 4143-4149.

Werner W.A., De Luca H.F. 2001 Metabolism of a physiological amount of all-trans-retinol in vitamin A-deficient rats. *Arch. Biochem. Biophys.* **393** 262-270.

White J.A., Beckett-Jones B., Guo Y.D., Dilworth F.J., Bonasoro J., Jones G., Petkovich M. 1997 cDNA cloning of human retinoic acid-metabolizing enzyme (hP450RAI) identifies a novel family of cytochrome P450 (CYP26). *J. Biol. Chem.* **272** (30) 18538-18541.

White J.A., Beckett B., Scherer S.W., Herbick J.A., Petkovich M. 1998 P450RAI (CYP26A1) maps to human chromosome 10q23-q24 and mouse chromosome 19c2-3. *Genomics* **48** (2) 270-272.

White J.A., Guo Y.D., Baetz K., Beckett-Jones B., Bonasoro J., Hsu K.E., Dilworth F.J., Jones G., Petkovich M. 1996 Identification of the retinoic acid-inducible all-trans-retinoic acid 4-hydroxylase. *J. Biol. Chem.* **271** (47) 29922-29927.

Wolf G. 2001 The discovery of the visual function of vitamin A. *J. Nutr.* **131** 1647-1650.

Yamamoto Y., Zolfaghari R., Ross A.C. 2000 Regulation of CYP26 (cytochrome P450RAI) mRNA expression and retinoic acid metabolism by retinoids and dietary vitamin A in liver of mice and rats. *FASEB J.* **14** 2119-2127.

Yanagawa Y., Chen J.C., Hsu L.C., Yoshida A. 1995 The transcriptional regulation of human aldehyde dehydrogenase 1 gene: The structural and functional analysis of the promoter. *J. Biol. Chem.* **270** 17521-17527.

Yoshida A. 1992 Molecular genetics of human aldehyde dehydrogenase. *Pharmacogen.* **2** 139-147.

Yoshida A, Ikawa M., Hsu L.C., Tani K. 1985 Molecular abnormality and cDNA cloning of human aldehyde dehydrogenases. *Alcohol* **2** (1) 103-106.

Yoshida, A., Rzhetsky A., Hsu L.C., Chang C. 1998 Human aldehyde dehydrogenase gene family. *Eur. J. Biochem.* **251** 549-557.

Zelent A., Mendelsohn C., Kastner P., Garnier J.M., Ruffenach F., Leroy P., Chambon P. 1991 Differentially expressed isoforms of the mouse retinoic acid receptor β are generated by usage of two promoters and alternative splicing. *EMBO J.* **10** 71-81.

Zelent A., Krust A., Petkovich M., Kastner P., Chambon P. 1989 Cloning of murine α and β retinoic acid receptors and a novel receptor γ predominantly expressed in skin. *Nature* **339** 714-717.

Zhang Q.Y., Dunbar D., Kaminsky L. 2000 Human cytochrome P-450 metabolism of retinoids to retinoic acids. *Drug Metab. Dispos.* **28** (3) 292-297

Zhao D., McCaffery P., Ivins K.J., Neve R.L., Hogan P., Chin W.W., Dräger U.C. 1996 Molecular identification of a major retinoic-acid-synthesizing enzyme, a retinaldehyde-specific dehydrogenase. *Eur. J. Biochem.* **240** 15-22.

Zile M.H. 1998 Vitamin A and embryonic development : an overview. *J. Nutr.* **128** 455S-458S.

ANNEXES

Characterization of the rat RALDH1 promoter[☆] A functional CCAAT and octamer motif are critical for basal promoter activity

Julie Guimond^{a,1}, Dominic Devost^{a,1}, Helene Brodeur^a, Sylvie Mader^{b,*}, Pangala V. Bhat^{a,*}

^aLaboratory of Nutrition and Cancer, Centre Hospitalier de l'Université de Montreal-Hotel-Dieu, Montreal, Quebec, Canada

^bDepartments of Biochemistry and Medicine, Université de Montreal, Montreal, C.P. 6128 Succursale Centre-Ville, Montreal, Quebec, Canada H3R 3N2

Received 17 July 2002; received in revised form 3 September 2002; accepted 6 September 2002

Abstract

Retinal dehydrogenase type 1 (RALDH1) catalyzes the oxidation of retinal to retinoic acid (RA), a metabolite of vitamin A important for embryogenesis and tissue differentiation. Rat RALDH1 is expressed to high levels in developing kidney, and in stomach, intestine epithelia. To understand the mechanisms of the transcriptional regulation of rat RALDH1, we cloned a 1360-base pair (bp) 5'-flanking region of RALDH1 gene. Using luciferase reporter constructs transfected into HEK 293 and LLCPK (kidney-derived) cells, basal promoter activity was associated with sequences between –80 and +43. In this minimal promoter region, TATA and CCAAT *cis*-acting elements as well as SP1, AP1 and octamer (Oct)-binding sites were present. The CCAAT box and Oct-binding site, located between positions –72 and –68 and –56 and –49, respectively, were shown by deletion analysis and site-directed mutation to be critical for promoter activity. Nuclear extracts from kidney cells contain proteins specifically binding the Oct and CCAAT sequences, resulting in the formation of six complexes, while different patterns of complexes were observed with non-kidney cell extracts. Gel shift assays using either single or double mutations of the Oct and CCAAT sequences as well as super shift assays demonstrated single and double occupancy of these two sites by Oct-1 and CBF-A. In addition, unidentified proteins also bound the Oct motif specifically in the absence of CBF-A binding. These results demonstrate specific involvement of Oct and CCAAT-binding proteins in the regulation of RALDH1 gene.

© 2002 Elsevier Science B.V. All rights reserved.

Keywords: Retinal dehydrogenase; Retinoic acid; Transcription factor

1. Introduction

Retinoic acid (RA), the active form of vitamin A, controls many biological processes such as cellular growth and differentiation, as well as embryonic development (Refs. [1–3] and references therein). The biological actions of RA are mediated through binding to a family of nuclear receptors (Ref. [4] and references therein). Two RA

isomers bind these receptors. 9-*cis* RA binds RA receptors (RAR) and retinoid X receptors (RXR), while all-*trans*-RA binds only RARs [5]. One aspect of retinoid signaling currently under intense investigation is the mechanism(s) regulating the synthesis of the active RA isomers from precursor retinoids. The major biosynthetic pathway of RA involves irreversible oxidation of the intermediate metabolite retinal to RA, catalyzed by cytosolic aldehyde dehydrogenases (ALDHs). ALDHs that convert retinal to RA include rat retinal dehydrogenase type 1 (RALDH1, ALDH1A1), mouse AHD-2 (m-AHD-2, aldh1A1), human ALDH1 (hALDH1, ALDH1A1), rat and mouse RALDH2 (ALDH1A2 and aldh1A2, respectively) and human and mouse ALDH6 (also called RALDH3, ALDH1A3) (Ref. [6] and references therein).

RALDH1 was initially purified and cloned from rat kidney by our laboratory [7,8]. We demonstrated that RALDH1 catalyzes all-*trans* and 9-*cis* retinal oxidation

[☆] The nucleotide sequence data reported in this paper will appear in Gene Bank with accession number AY 079047.

* Corresponding authors. S. Mader is to be contacted at Tel.: +1-514-343-6111x5173; fax: +1-514-343-2210. P. Bhat, Research Centre, CHUM-Hotel-Dieu, 3850 Saint Urbain Street, Montreal, Quebec, Canada H2W 1T8. Tel.: +1-514-890-8000x12927; fax: +1-514-412-7152.

E-mail addresses: [redacted] (S. Mader), [redacted] (P.V. Bhat).

¹ Contributed equally to this work.

with high efficiency, 9-*cis* retinal being a better substrate [9]. RALDH1 is highly expressed in the developing kidney and is also present in other vitamin A target organs, such as the stomach and intestine [10,11]. RALDH1 is mainly localized in these tissues in cells of epithelial origin, in agreement with a role in the production of RA needed for proper differentiation of the epithelia. Furthermore, vitamin A and differentiation status regulate the expression of RALDH1 gene in the stomach, intestine and trachea [11,12]. Thus, RALDH1 expression patterns suggest a tissue- and development stage-specific control of gene expression. However, little is known about the molecular mechanism(s) controlling appropriate expression of the RALDH1 gene. To explore the regulatory mechanisms of RALDH1 gene expression and to identify regulatory regions important for its tissue-specific expression, we have characterized the 5'-flanking region of the rat RALDH1 gene.

2. Experimental procedures

2.1. Cell lines and culture conditions

HEK 293 (human embryonic kidney), LLCPK (pig kidney proximal tubule), Caco2 (human colon adenocarcinoma), and HepG2 (human hepatoma) cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (Gibco BRL) supplemented with 10% (v/v) fetal bovine serum (FBS, Biomed), high glucose, sodium pyruvate, non-essential amino acids, 100 units/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin (Sigma) at 37 °C in an incubator containing air/CO₂. GC (rat somatolactotroph) cells were cultured under similar conditions except that 10% FBS was replaced by 12.5% and 2.5% horse and bovine serum, respectively.

2.2. Cloning of the 5'-flanking region of rat RALDH1 gene

A rat genomic library, EMBL3 SP6/T7 (Clontech), was screened with a RALDH1 cDNA fragment spanning the exon I and the beginning of exon II (nucleotides corresponding to amino acids 1–59, probe I) [8]. Six positive clones were obtained and purified through three rounds of screening. The purified clones were digested with *Eco*RI to release the cloned fragments. An 11-kb insert that hybridized with probe I and also with an end-labeled RALDH1 oligonucleotide complementary to the sequence surrounding the initiating ATG in exon I of RALDH1 (5'-AGGCTGTGCAGGGGAAGACATTG-3', probe II) was isolated and digested with *Hind*III. This resulted in two DNA fragments, 6 and 3 kb, which hybridized respectively with probe I and II, and with probe I. The 6- and 3-kb fragments contained the 5'-flanking region and exon I, and the exon II of RALDH1, respectively. DNA sequencing in both directions was performed using the T7 sequencing kit (Amersham Pharmacia Biotech) and appropriate oligonucleotide primers.

2.3. Location of the transcription start site

Total RNA was isolated from rat kidney with Trizol (Roche Molecular Biochemicals). Primer extension was carried out to establish the full-length 5' end of RALDH1 mRNA using probe II (see above) and probe III, an antisense oligonucleotide complementary to sequences in exon II (5'-TGCCACTCACTGAATCATGCCATTC-3'). The end-labeled primers were annealed with 10 µg baker's yeast tRNA or 50 µg of rat kidney total RNA in 1 × hybridization solution (20 mM Tris-HCl, pH 8.3, and 120 mM KCl) for 20 min at 65 °C and for 90 min at 42 °C. The DNA strand was extended with 40 units of AMV reverse transcriptase (Amersham Pharmacia Biotech). The primer extension products were analyzed by electrophoresis on a 6% polyacrylamide gel.

2.4. Generation of luciferase reporter constructs

The flanking restriction sites *Bam*HI and *Hind*III were introduced in the sequence –1360 to +43 of the RALDH1 promoter region respectively by polymerase chain reaction (PCR) and were cloned into the unique cloning sites (*Bam*HI and *Hind*III) of a promoterless luciferase vector, TKSL (Amersham Pharmacia Biotech). The deletion constructs RALDH – 624, RALDH – 450, RALDH – 286, RALDH – 200, RALDH – 111, RALDH – 80, RALDH – 65 and RALDH – 48 were generated by PCR amplification, followed by insertion of the PCR products at the *Bam*HI and *Hind*III restriction sites of TKSL. All constructs were sequenced to confirm that no mutations occurred during PCR amplification.

2.5. Site-directed mutagenesis

Mutagenesis of CCAAT and octamer (Oct) motifs was performed by two rounds of PCR [13]. The following oligonucleotides (single-strand sense and antisense oligonucleotides with the restriction sites underlined and mutated sites italicized) served as primers:

RALDH – 111: 5'-acggatcctgagtagtgcccttcctgcc-3'
 Mut – 65: 5'-ttgcatatcgccatagatcatcgaggcagactcag-3'
 Mut – 48: 5'-cctgcactaagggtcgatcatatcgccatgattg-3'
 Mut – 48/ – 65: 5'-cctgcactaagggtcgatcatatcgccatagatcatc-3'
 RALDH + 43: 5'-actaagcttgctggttgctcctggaacaca-3'

In the first PCR round, the sense RALDH – 111 and antisense mut – 48, mut – 65 and mut – 48/ – 65 primers were employed in separate reactions. In the second PCR round, the first PCR products and the antisense RALDH + 43 primer were used. PCR was performed for 30 cycles. The mutants generated were cloned in TKSL vector at the *Bam*HI and *Hind*III sites and sequenced to verify mutations with the T7 sequencing kit (Amersham Pharmacia Biotech).

2.6. Transfection and luciferase assay

HEK 293, and LLCPK cells (0.5×10^6 cells/ml) and HepG2, GC and Caco2 cells (1×10^6 cells/ml) were seeded in 12-well tissue culture plates for 24 h, then transfected with 2.5 μ g of reporter constructs and 1 μ g of RSV- β Gal as a control for transfection efficiency. Transfection was carried out using either standard calcium phosphate co-precipitation or DEAE-dextran techniques [14]. LLCPK cells were treated with chloroquine shock (50 μ g/ml), and the medium was changed 6 h after transfection. The medium was replaced 24 h after transfection for other cell lines. The cells were washed with phosphate-buffered saline 48 h after transfection and harvested by scraping in lysis buffer (50 mM Tris, pH 7.8, 1 mM EDTA, and 0.1% Triton). The cell

lysates were centrifuged, and the supernatant was used for luciferase and β -galactosidase assays. Luciferase activity was measured in a Lumat LB 9507 (EG & G Berthold) luminometer. The experiments were performed in triplicate, and similar results were obtained from three independent experiments. The data were expressed as relative luciferase activity over β -galactosidase activity to normalize for transfection efficiency.

2.7. Preparation of nuclear extracts

Nuclear extracts from cultured cells were prepared according to the protocol of Dignam et al. [15]. They were rapidly frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until used. Protein concentration was measured with the BCA

-1360	acagcgttga	tattgatatg	tccaggaaga	tgaaaatggt	tcccgtctgc	ttcgttaagag
			AP1			
-1300	aaagtttgct	attcctgtta	ggttgactga	aagtgaaacc	ataaacttcca	tgtgtataac
-1240	tactgaatgg	aagatcccaa	acatgaccct	aggtggggat	cacaggatcg	atattaaggc
-1180	aggtctggaa	aagaagacta	atatctcgga	gtgctttgcc	tgaggtgaaa	ttccagcctt
-1120	atcctgccag	gtctgtgacc	ataagctgta	ttcctctctg	tctttagaaa	atgtgcagct
	AP1					
-1060	cagtcaaggt	gaaaagaac	acattcccca	ggctcctggt	cctcccccta	gctaagtcct
-1000	agtgacgggg	aagtggcaat	ttcatttcga	agacgttatc	actaattctt	ataaaccaga
-940	gcacctaag	aatgttatct	tgctccttcc	atatcttggt	caggagcatc	aacacagaga
-880	agcattgtat	tcaaaatgaa	aacactacag	ttaaagttcg	tcctttacca	agttcccagc
-820	tcaaaacatt	acgaatttaa	actcttaggg	ggcaatattt	acattctttc	cttctatgct
-760	gcctagacta	aagattcaaa	gtgcagacac	ttcccaaata	agacattact	ttcactttaa
-700	atgaatttcc	acagatggct	ttggcataat	gttctctgag	ggctctcggt	tgacaaggaa
	AP1					
-640	ctctgactga	aaagtcctgc	acagttttct	gttcccacca	aatagaaggg	acaaagacaa
-580	tttgaagttc	ctaataatac	attagtttgt	aggaatttct	tttatttcag	ttggggaaga
	GATA					
-520	tagtctagga	aaagagcatt	tctccctaac	agtaccctga	tcagctggga	taaggatgga
-460	ttctctggtg	gccatgtcag	gcagattcat	agtcctctcc	tcctcagctc	ctggggagag
			C/EBPβ			
-400	tgagaacagg	ggtagatatt	tcattcattgc	aatgtctttg	ttccccagtc	tgtgtgagca
-340	gaaaagtac	acagtagcct	aacaagcagg	aaaaggcaag	aaaacaaaaa	agaactggct
			MEP1			
-280	tccagtgtct	ggagcagctg	cacacacacc	cttagcacag	gtttggttg	gtaaattaat
-220	tcattctgta	atagttagca	gtctccagct	ggaactttgg	agctaagggt	cagggtcctt
			Sp1			
-160	aaggatttac	atttaaaggc	aaaggctccc	tgcccttagg	tgttacaagt	gagtagtgcc
	Sp1		CCAAT	Box	OCT	
-100	cttctgccc	tgccctgagt	ctggccatcc	aatcatatgc	cgatatgcaa	atgaccctta
	GATA	TATA Box			+1 EXON I	
-40	gtgcaggcag	ataaaaagga	gcaaatgctc	tttcagaacc	AATTTGCTGA	GCCTGTCACC
	TGTGTCCAG	GAGCCAAACC	AGCAATGTCT	TCCCCTGCAC	AGCCTGCAGT	TCCTGCCCCA
	CTGGCCAACT	TGAAGATTCA	ACACACCAAG	gtagtgcact	tg.....ctatc	atcacacATC
	TTCATAAACA	ATGAATGGCA	TGATTCACTG	AGTGGCAAGA	AATTCCTGT	
	CCTTAACCCCT	GCAACTGAGG	AGGTCATCTG	CCATGTGGAA		

Fig. 1. Nucleotide sequence of the 5'-flanking region of the rat RALDH1 gene. All nucleotide positions are numbered relative to the transcriptional start site (+1). The nucleotides present in the mRNA are in upper case letters; intron I and flanking sequences are in lower case letters. Potential consensus sequences for regulatory elements and transcriptional factor-binding sites and the ATG start codon are in bold.

	Sp1			Sp1			
-140	aaaggctccc	tgccctagg	tggtac aagt	gagtagtgcc	cttctgccc	tgccctgagt	RALDH1
	-----	-----	-t---c---	-----	-----	-----	pbALDH
	-----tt-	a-----	-----c---	-----g---	-----a---	-----	m-AHD-2
	-----t-	-----	-----a-	a-----t-gtt	-----ttttt	-----t---	hALDH1
	CCAAT Box		OCT		GATA	TATA Box	
-80	ctggccatcc	aatcatatgc	cgatatgcaa	atgaccctta	gtgcaggcag	ataaaaagga	RALDH1
	-----	-----	-----	-----	-----	-----	pbALDH
	---c-----	-----c-	-----	-----	-----t---	-----	m-AHD-2
	t--tt-----	---g---c-	gag-----	--a-a-t---	-cc-gt---	--a-----	hALDH1
				+1			
-20	g	caaatgctc	tttcagaacc	AATTGCTGA	GCCTGTCACC	TGTGTTCCAG	RALDH1
	-	---g---	-----	-----	-----	-----	pbALDH
	-	---gg---	-----	-----	-----	-----	m-AHD-2
	acaataaag	c---g---	-a-----	--A-----	--A-----	-----	hALDH1
			EXON I				
+40	GAGCCAAACC	AGCAATGTCT	TCCCCTGCAC	AGCCTGCAGT	T CCTGCCCCA	CTGGCCAACT	RALDH1
	-----	-----	-----	-----	-----	-----	pbALDH
	-----G--T-	--A-----A	--G-----	-A---CG---	C-----	-----G---	m-AHD-2
			INTRON I				
	TGAAGATTCA	ACACACCAAG	gttagtcact	tg...	ctatcatcac	acATCTTCAT	RALDH1
	-----	-----	-----	-----	-----T--	pbALDH
	-----	-----T---	-----	-----	-----	m-AHD-2
	-----	-T-T--T--	-----	-----	-----	hALDH1
		EXON II					
	AAACAAATGAA	TGGCATGATT	CAGTGAGTGG	CAAGAAATT	CCTGTCCTTA	ACCCTGCAAC	RALDH1
	-----	---CA-C-	--T---A-	-----	-----A---	-----	pbALDH
	-----	---CA---	-----C-	-----	--A-T---	-----	m-AHD-2
	-----	-----	-----	-----	-----T---	-T-----	hALDH1
	TGAGGAGGTC	ATCTGCCATG	TGGAA				RALDH1
	---A-----	-----	-----				pbALDH
	-----	-----C-	-----				m-AHD-2
	-----AG	C-----G-	-A---				hALDH1

Fig. 2. Comparison of nucleotide sequences of proximal promoter regions of rat, mouse and human ALDHs. Sequence identity between ALDHs is indicated by dashes and nucleotide deletions by blank spaces. The transcriptional start site (+1) is shown, and numbering relative to RALDH1 starts from this position. The start codon ATG and transcriptional factor-binding sites are in bold.

protein assay kit (Pierce,) with bovine serum albumin (BSA) as standard.

2.8. Electrophoretic mobility shift assay (EMSA)

EMSA experiments were performed with 1 µg of nuclear extracts. Different EMSA probes were generated by annealing complementary oligonucleotides each containing five to

seven unpaired nucleotides. Sticky ends were filled with Klenow fragment and labeled with [α - 32 P]dCTP. The nuclear extracts were mixed with 50,000 cpm of labeled probes, 1 µg of poly(dI-dC) in EMSA buffer [12 mM HEPES, pH 7.9, 12% glycerol, 1.5 mM MgCl₂, 35 mM KCl, 1.5 mM dithiothreitol (DTT), and 300 µg/ml BSA] in a total volume of 30 µl. The reaction mixture was incubated for 30 min at room temperature. The mixture was subjected

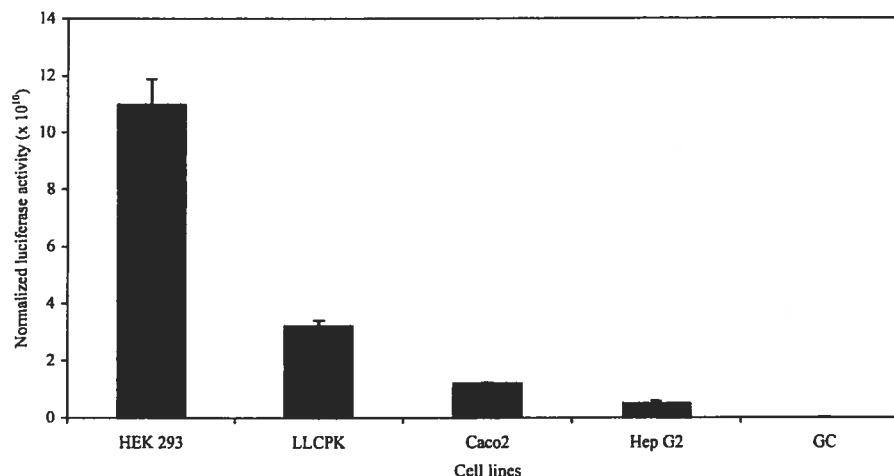


Fig. 3. Expression of luciferase activities in HEK 293, LLCPK, Caco2, HepG2 and GC cells. A reporter vector containing the 5' region of RALDH1 subcloned in front of the luciferase gene (Luc-RALDH - 1360, see Experimental procedures) was transfected into different cell lines, as indicated. A promoterless vector (TKSL) was used as negative control (not shown), and RSV-βGAL was cotransfected to measure transfection efficiency. The results are mean ± S.D. of triplicate determinations and expressed as normalized luciferase activity.

to electrophoresis in 4% non-denaturing polyacrylamide gel containing 2.5% glycerol in 0.25 × Tris–Borate–EDTA electrophoresis buffer.

For super shift analysis, 2 µl of specific (Oct-1,2,3/4,6; CBF/A, C/EBPβ, STAT-5b) antisera (Santa Cruz Biotech) were incubated with nuclear extracts for 15 min before addition of the probe. In competition assays, a large excess (1000- to 500-fold) of unlabeled, double-stranded oligonucleotide competitor was incubated together with nuclear extract before adding the labeled probe. The following sense (S) and antisense (AS) oligonucleotides (mutated sequences are underlined) were used in the EMSA and super shift studies:

RALDH WT-S: 5'-tctggccatccaatcatatgccgatgcaaatga-3'

RALDH WT-AS: 5'-ctaagggtcatttgcataatcgccatgattgatgg-3'

RALDHmut – 48-S: 5'-tctggccatccaatcatatgccgatgatcga-3'

RALDHmut – 48-AS: 5'-ctaagggtcgatatcatatcgccatgattggatgg-3'

RALDHmut – 65-S: 5'-tctggccatcgatatctatgccgatgcaaatga-3'

RALDHmut – 65-AS: 5'-ctaagggtcatttgcataatcgccatgatcga-3'

RALDHmut – 48/ – 65-S: 5'-tctggccatcgatatctatgccgatgatcga-3'

RALDHmut – 48/ – 65-AS: 5'-ctaagggtcgatatcatatcgccatagatatcgatgg-3'

AD5-S: 5'-aaggggatccgtgtacacaggaagtgacaattttc

AD5-AS: 5'-aggaagatctcgaaattgtcacttctgtgtac-3'

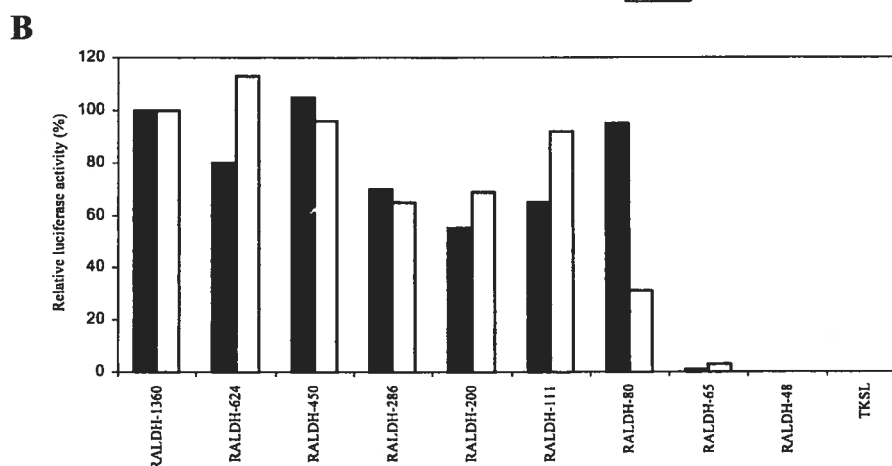
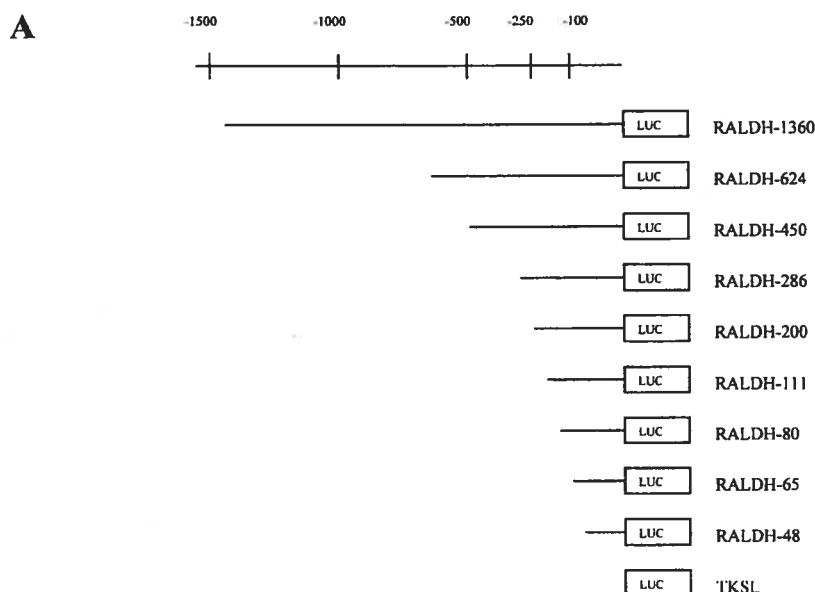


Fig. 4. Functional analysis of the promoter elements of the rat RALDH1 gene. The various deletion constructs containing different lengths of the 5' region (A) were transfected into HEK 293 (solid bar) and LLC PK (blank bar). The TKSL plasmid was a promoterless negative control. The vector RSV-βGal served to determine transfection efficiency. Luciferase activities were calculated as the percentages of full-length (RALDH – 1360) activities in each cell line (B).

DR1-S: 5'-aaggggatccgtgtacaggtcacaggtcaatttc
 DR1-AS: 5'-aggaagatctcgaaaattgacctgtgacctgtac-3'
 NBRE-S: 5'-aaggggatccacgagagatagaaggtcagacgact-3'
 NBRE-AS: 5'-aggaagatctagtcgtctgacctttctatctctcgt-3'

AD5 are random oligonucleotides. DR-1 and NBRE are oligonucleotides containing a RA response-like element (RARE) (direct repeat of AGGTCA) and a NGFI-B responsive element (AAAGGTCA), respectively.

3. Results

3.1. Cloning of the 5'-flanking region of rat RALDH1 gene

Among class I cytosolic rat ALDHs, namely RALDH1, RALDHII, RALDHIII and phenobarbital-induced ALDH (pb-ALDH), RALDH1 and pb-ALDH are the most closely related ALDHs (89.6% amino acid sequence identity). The first 66 nucleotides of the coding region (exon I) of pb-ALDH are conserved in RALDH1 [16]. Differences in nucleotide sequences between RALDH1 and pb-ALDH were evident in exon II (Fig. 2). Therefore, to differentiate between the RALDH1 and pb-ALDH genes during screening of a rat genomic library, we used both a cDNA fragment spanning the exon I and the beginning of exon II (probe I), and an

oligonucleotide probe hybridizing to the region surrounding the initiator ATG in exon I (probe II). We obtained a positive clone containing an 11-kb insert that hybridized with both probes. From the 11-kb insert, we obtained two fragments (6 and 3 kb) after digestion with *Hind*III. The 6-kb fragment hybridized with probes I and II, indicating that it contains exon I sequences, whereas the 3-kb fragment hybridized only with probe I, suggesting it contains only exon II. Sequencing the 6- and 3-kb fragments from both directions demonstrated the authenticity of the cloned genomic region as that of RALDH1 and indicated that the 6-kb fragment contains 1.36 kb of 5'-flanking region, the first exon and part of intron I, while the 3-kb fragment contained the rest of intron I and the beginning of exon II (Fig. 1). The nucleotide sequence of the 5'-flanking region, starting from –1360 to the transcriptional start site +1, is shown in Fig. 1. Scanning of the 5'-flanking region for putative regulatory elements showed a TATA box at –26 and a CCAAT box at –68 (Fig. 1). A number of potential responsive elements, such as Oct, AP1, SP1, and GATA, were also present in this region. Primer extension analysis showed an extension product of 65 and 150 base pairs (bp) from probes II and III, respectively (not shown), indicating that transcription is initiated 44 bp upstream from the ATG codon (Fig. 1).

In addition to RALDH1, other homologues such as m-AHD2 and hALDH1 have been shown to be involved in the

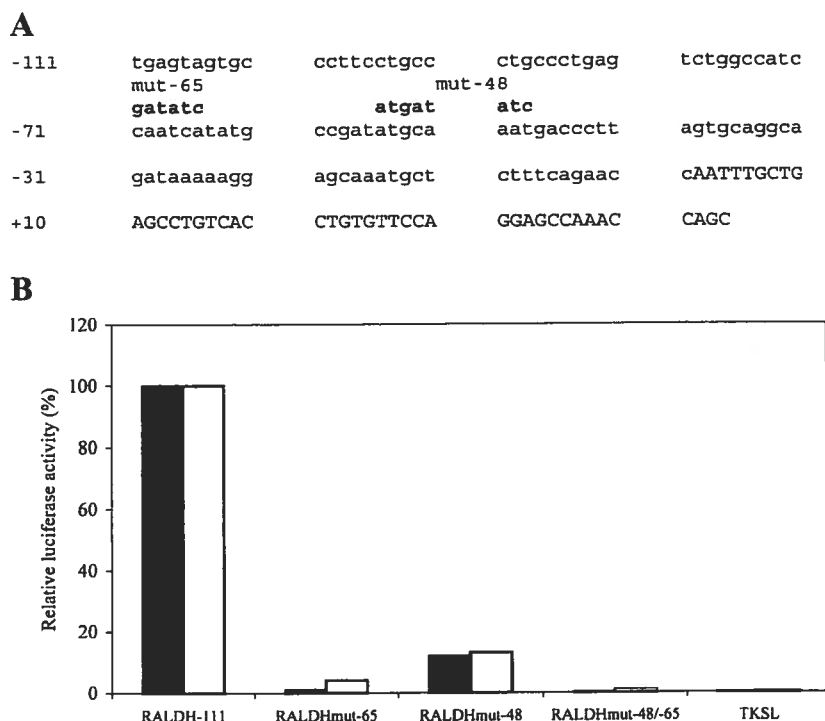


Fig. 5. Effect of CCAAT and Oct motif mutations on rat RALDH1 promoter activity. Mutations were introduced in the luciferase vector containing a fragment of the RALDH1 promoter (RALDH – 111) by PCR. (A) Schematic representation of nucleotide modifications introduced in the CCAAT and Oct motifs. Modified nucleotides shown in bold. (B) Luciferase activities of mutated reporter vectors in HEK 293 (solid bar) and LLCPK (blank bar) cells. Relative luciferase activities are presented as percentages of wild-type promoter activity (RALDH – 111).

synthesis of RA [9]. On the other hand, pb-ALDH, which has a high degree of homology with RALDH1, m-AHD-2 and hALDH1, does not catalyze retinal oxidation [17]. Comparison of sequences of the rat RALDH1 proximal promoter region revealed similarities with pb-ALDH [16], m-AHD-2 [18] and hALDH1 [19] (Fig. 2). The CCAAT and ATAAA boxes are well conserved in these ALDHs. An Oct-binding site is conserved in RALDH1, m-AHD-2 and hALDH1, but not in pb-ALDH, due to a 16-bp deletion upstream of position -40 . In addition, a 7-bp deletion, upstream of position -82 , exists in pb-ALDH. A striking difference in the proximal promoter region between mouse, rat and human genes is a 10-bp deletion 20 bp upstream from the transcriptional start site in the rat promoter. Several nucleotide substitutions were also found between RALDH1 and hALDH1 throughout the proximal promoter region (Fig. 2).

3.2. Functional characterization of the rat RALDH1 promoter region

The activity of the cloned 1360-bp 5'-flanking region of RALDH1 was examined in various cell lines in a transient-transfection experiment, using a luciferase reporter construct. Except for GC cells, the other cell types showed basal promoter activity (Fig. 3). The highest activity was observed in the kidney-derived cell lines HEK 293 and LLCPK. These results indicate that the 5'-flanking region can direct cell type-specific expression.

To identify the critical elements required for promoter activity, luciferase reporter constructs containing progressive deletions of -1360 -bp fragments were transfected into HEK 293 and LLCPK cells. Progressive removal of the 5'-sequences from -1360 to -80 did not significantly affect the reporter gene expression (Fig. 4A and B). However, a drastic decrease in luciferase activity was observed in cells transfected with the RALDH -65 and RALDH -48 luciferase constructs (Fig. 4B). These results suggest that the -80 to -48 region is critically important for basal promoter activity. Sequence analysis in this region showed the existence of a CCAAT box (-72 to -68) and an Oct-binding site (-56 to -49). To investigate the possible importance of these regulatory elements in governing basal promoter activity, site-directed mutations were introduced into these putative sites, and the functional consequences of the mutations were then examined with luciferase reporter constructs transfected into three kidney cell lines.

Mutation of the CCAAT box (Fig. 5A) resulted in the virtual abolition of luciferase activity, indicating that the CCAAT motif is critical for basal promoter activity (Fig. 5B). On the other hand, 80–90% of luciferase activity was lost when the Oct-binding motif was mutated (Fig. 5A, RALDHmut -48 , Fig. 5B), suggesting involvement of the Oct motif in promoter activity. Furthermore, double mutation of the CCAAT box and Oct-binding motif (RALDHmut $-48/-65$, Fig. 5B) resulted in complete loss of

promoter activity. These data strongly indicate that CCAAT and Oct motifs are essential for basal promoter activity of the RALDH1 gene.

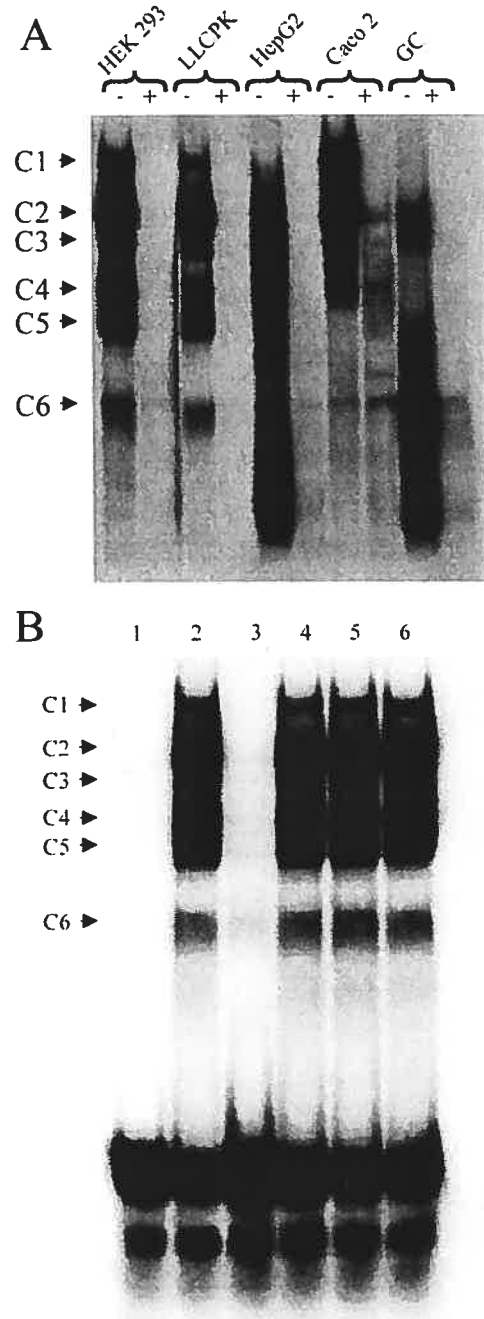


Fig. 6. EMSA with nuclear extracts from HEK 293, LLCPK, HepG2, Caco2 and GC cells. (A) A labeled fragment representing nucleotides -81 to -40 of RALDH1 promoter was incubated with nuclear extracts from various cell lines in the presence (+) or absence (–) of 100-fold excess unlabeled fragment. (B) Competition with non-specific oligonucleotides in nuclear extracts from HEK 293 cells. Lane 1, control without added nuclear extract; lane 2, with nuclear extract; and lanes 3–6, competition with unlabelled fragments (-81 to -40), DR-1 motif (RARE, AGGTCA repeat), NBRE (NGIF-B response element, AAAGGTTC) and AD5 (non-specific), respectively.

3.3. EMSA and super shift experiments demonstrate the presence of CBF-A (NF-YB) and Oct-1 proteins in the DNA–protein complex

Incubation of a labeled probe comprising the sequence from –81 to –40 (RALDH WT) with nuclear extracts from HEK 293, LLC PK, HepG2, Caco2 and GC cells resulted in the appearance of several labeled bands (Fig. 6A) in EMSA analysis. Nuclear extracts from kidney cells (HEK 293 and LLC PK) produced six bands, C1–C6 (Fig. 6A) with the labeled probe. Note that identical complexes were formed with the two kidney cell lines, whereas different patterns of complexes were formed in HepG2, CaCo2 and GC cells. Excess of unlabeled fragment inhibited formation of all complexes with the radioactive probe. Specificity of binding was also verified using non-specific (AD5) unlabeled oligonucleotides in the competition assays (Fig. 6B, lane 6). Competition experiments with increasing concentrations of unlabeled specific probe using a nuclear extract from HEK 293 cells indicate that while all complexes were abrogated by the specific competitor, complex 1 (C1) was competed faster than other complexes (Fig. 7).

The binding of nuclear proteins to the –81 to –40 (WT) sequence was challenged with excess unlabeled oligos containing internal mutations at –48 (Oct motif, RALDHmut –48), at –65 (RALDHmut –65, CCAAT box) and double mutations at –48/–65 (RALDHmut –48/–65) in EMSA experiments. DNA fragments mutated at –48 competed for formation of the C1 and C3 complexes (Fig. 8, lane 4), indicating that these complexes contain factors that do not bind the Oct motif. DNA fragments mutated in the CCAAT box eliminated formation of complexes C2, C4, C5 and C6, indicating that these complexes contain proteins

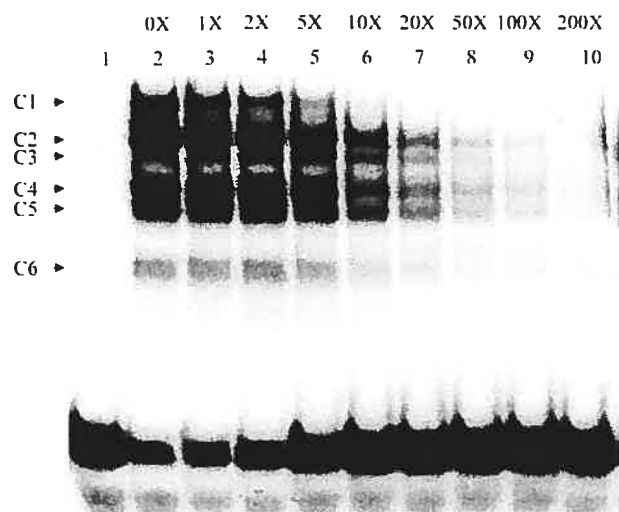


Fig. 7. High-affinity DNA-binding protein in nuclear extracts. HEK 293 nuclear extracts were incubated with labeled nucleotides (–81 to –40). Lane 1: Incubation without nuclear extracts. Lane 2: Incubation with nuclear extracts. Lanes 3–10: Competition with increasing concentrations (1 × to 200 ×) of unlabeled nucleotide fragments.

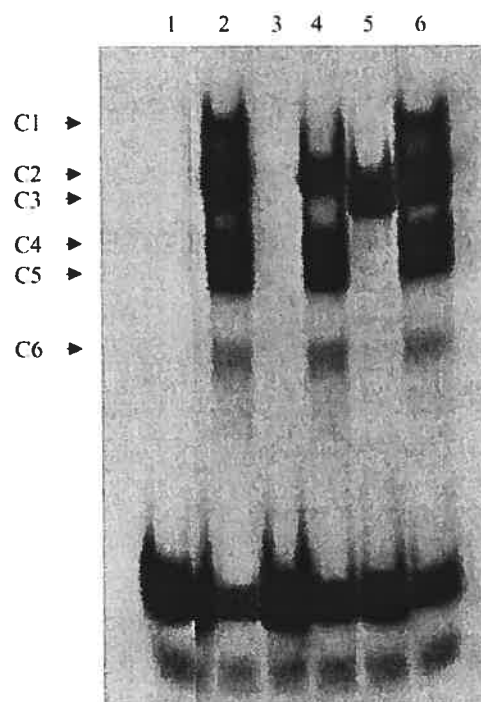


Fig. 8. Competition with unlabeled CCAAT and Oct mutants. EMSA was performed with nuclear extracts from HEK 293 cells as in Fig. 7. Lane 1: Incubation without nuclear extract. Lanes 2 and 3: Incubation and competition with labeled and unlabeled probes (–81 to –40), respectively. Lanes 4 and 5: Competition with 100-fold excess unlabeled mutant –48 and –65 (Oct and CCAAT motifs, see Fig. 5A), respectively. Lane 6: Competition with unlabeled –48/–65 double mutant.

binding outside of the CCAAT box sequence (Fig. 8, lane 5). The double mutated (RALDHmut –48/–65) oligo did not compete with any labeled complexes (Fig. 8, lane 6), suggesting that the binding of these complexes is limited to those two elements. Of note, formation of the C1 complex could be competed by either of the single mutated oligonucleotides, but not by the double mutated oligos (Fig. 8, lanes 4–6). Together, these results suggest formation of complexes containing proteins bound to the Oct motif (C1, C2, C4, C5, and C6) or to the CCAAT Box (C1, C3), with occupancy of both sites in the C1 complex.

To further define the nature of proteins within the different complexes, we performed super shift assays using a promoter fragment containing sequences between position –81 and –43. Anti-Oct-1 antibody shifted the C1 and C2 complexes to higher regions in the gel (Fig. 9, Lane 4), suggesting that Oct-1 binds to the Oct sequence to form C1 and C2. The anti-Oct-2, 3/4, and 6 antibodies did not affect formation of the complexes (not shown). Since competition experiments suggested that complexes C3 and C1 contain proteins bound to the CCAAT box, we sought to identify which proteins among several nuclear factors including CBF-A (NF-YB) and C/EBP β may bind to these complexes. In super shift assays, an anti-CBF-A, but not an anti-C/EBP β antibody, shifted the mobility of C1 and C3 (Fig. 9, lane 6). In contrast, addition of an anti-STAT5

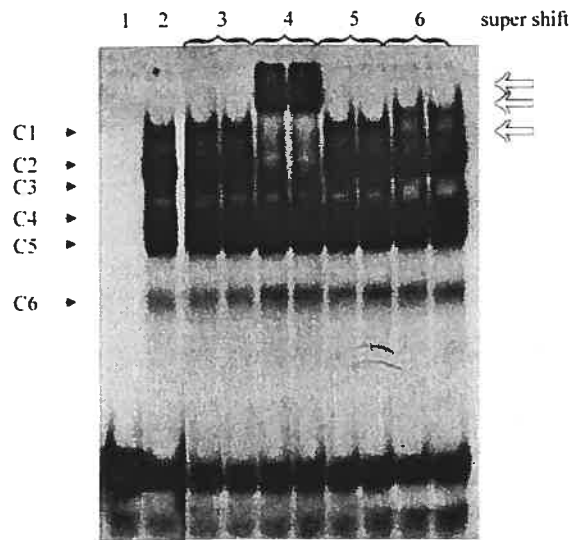


Fig. 9. Anti-Oct-1 and anti-CBF (NF-YB)-antibody super shift of the DNA–protein complex formed with nuclear extracts from HEK 293 cells. EMSAs were performed by incubating HEK 293 cell nuclear extracts with the labeled –81 to –40 fragment of the rat RALDH1 gene. In super shift assays, specific antibodies were added before incubation with the labeled probe. Lane 1: Incubation without nuclear extracts. Lane 2: Incubation with nuclear extracts. Lane 3: Incubation with non-specific antibody (STAT-5). Lane 4: Incubation with 2 and 4 μ g anti-Oct-1 antibody. Lanes 5 and 6: Incubations with 2 and 4 μ g of anti-C/EBP β and anti-CBF-A (NF-YB) antibodies, respectively. Arrows indicate the shifted bands.

antibody had no effect (Fig. 9, lane 3), confirming the specificity of immunoreaction with anti-Oct-1 and anti-CBF-A.

Together, these results suggest that binding of Oct-1 and CBF-A is responsible for formation of complexes C2 and C3, respectively, and that both proteins bind simultaneously to form complex C1 in nuclear extracts from HEK 293 and LLCPK cells. In addition, other as yet unidentified factors bind to the Oct motif to form complexes C4, C5 and C6. Finally, it is noteworthy that although the Oct and CCAAT box are binding sites for ubiquitously expressed transcription factors, assembly of proteins on these sites appears to be tissue-specific, with a specific pattern of binding in cells of kidney origin.

4. Discussion

Several studies including ours have demonstrated that RALDH1 expression is developmental stage and tissue-specific with a correlation between the RALDH1 expression patterns and RA synthesis [10,20–22]. We and others have discovered that vitamin A status regulates RALDH1 expression [11,23]. These observations prompted us to clone and characterize the 5'-flanking region of RALDH1 gene. The cloned 1360-bp promoter showed high luciferase activity in HEK 293 and LLCPK kidney cell lines (Fig. 7), although luciferase activity was lower in LLCPK compared to HEK

293 cells. This could be due to a lower expression of transcriptional factors needed for RALDH expression in LLCPK cells. Alternatively, there could be some differences in the transcription factors binding to the RALDH promoter in these two cell lines, in spite of their common kidney origin. Note in this respect that RALDH –80 was as active as RALDH –1360 in HEK293 cells, while expression from the RALDH –80 promoter was only about 30% compared to that of the full-length promoter in LLCPK cells. This may reflect differences in the cell type, degree of differentiation, or species of origin of these cells.

Sequence analysis of the promoter revealed several putative regulatory elements (Fig. 1). Transfection studies, using RALDH1 gene deletion constructs and mutants linked to a luciferase reporter vector, demonstrated that CCAAT and Oct motifs are essential for promoter activity. Recently, Elizondo et al. [24] reported that RA down-regulated hALDH1 expression through RAR and C/EBP β in mouse hepatoma-derived Hepa-1 cells, and identified a putative RARE located at –91/–75 bp adjacent to the CCAAT box of hALDH1 gene. Although the proximal promoter regions of rat RALDH1 and hALDH1 have a high degree of homology (Fig. 2), we did not observe any effect of RA either on mRNA expression or on promoter activity in HEK 293 and LLCPK cells (not shown). Examination of the nucleotide sequences that acts as putative negative RARE in hALDH1 (TGTTCA) with the RALDH1 sequence identified two nucleotide substitutions (TGGCCA) in that region (Fig. 2). These two nucleotide substitutions may prevent this sequence from functioning as a negative RARE. Furthermore, the consensus RAR binding sequence (RARE DR-1) did not compete with any of the complexes in EMSA, indicating that RAR or RAR/RXR complexes do not bind to the labeled probe (Fig. 6B). These results suggest that the RARE found in the hALDH1 gene is not conserved in rat RALDH1. Lack of conservation of this putative RARE was also observed in the chicken ALDH1 gene [25]. Our results also suggest that RA does not act through the 1.36-kb promoter in the regulation of RALDH1 gene expression. In vivo, RA regulation of rat RALDH1 may be mediated through other sequences or involve indirect regulation.

The CCAAT box is one of the most common *cis*-acting elements present in the eukaryotic promoter. Several CCAAT-binding proteins have been described (Refs. [26,27] and references therein). They include C/EBP β , CTF/NF1, HSB-CBF and NF-YB. Super shift assays identify NF-YB as the primary factor interacting with the CCAAT region of RALDH1 gene (Fig. 9). NF-YB is a ubiquitous CCAAT-box binding factor with a strong preference for specific CCAAT-box flanking sequences. NF-YB binding to the RALDH1 CCAAT box has been observed not only in nuclear extracts from HEK 293 cells, but also in LLCPK and MDCK cells (not shown), suggesting that in kidney cells derived from different species, NF-YB is the

key transcriptional factor binding to the CCAAT motif of RALDH1 gene. In contrast, the CCAAT motif of the hALDH1 proximal promoter region binds both NF-YB and C/EBP β nuclear factors [19,24], when nuclear extracts from human hepatoma cells (HepG2) and mouse hepatoma-derived cells (Hepa-1) are used respectively, in super shift assays.

Super shift experiments with anti-Oct-1 to -6 antibodies demonstrated the specific binding of Oct-1 antibody to the Oct motif (Fig. 9). Oct-1 is a ubiquitously expressed transcriptional factor [28]. It is a member of the POU homeo-domain family. High-affinity Oct-1-binding sites have been found in a number of cellular promoters [29–33]. Oct-1 also negatively regulates certain genes [34] and is involved in developmental and cell cycle regulation [35]. It has been reported that Oct-1 is activated by differential phosphorylation during the cell cycle, and phosphorylated Oct-1 is responsible for transcriptional regulation of the histone H2B gene [35]. Whether modulation of Oct-1 activity by post-translational modifications is important for tissue and stage-specific expression of RALDH1 remains to be investigated.

Complex C1 was found to result from binding of nuclear factors from kidney cells bound to both CCAAT and Oct motifs (Fig. 8). Super shift assays confirmed that both NF-YB and Oct-1 are found in this complex (Fig. 9). Furthermore, competition experiments with increasing concentrations of cold probe showed that C1 is competed faster than other complexes (Fig. 7), in agreement with necessity of binding by both proteins in this complex but not in complexes C2–C6. Functional interactions between NF-YB with other transcriptional factors or nuclear proteins have been reported [36–39]. The drastic effect of mutating either the Oct site or CCAAT box in the promoter suggests that synergy between NF-YB and Oct-1 may be important for RALDH1 expression.

It is noteworthy that despite the fact that Oct-1 and NF-YB are ubiquitously expressed transcriptional factors, C1 is present only in some but not all cell nuclear extracts tested (Fig. 6). This may indicate competition by other proteins in non-kidney cells or participation, along with Oct-1 and NF-YB, of one or more kidney-specific factors. In addition, several other nuclear factors also bound to the Oct sequence independently of Oct-1 to form complexes C4, C5, and C6. These factors may be still unidentified Oct protein family members, and may be expressed in a tissue-specific manner as these complexes were not observed in HepG2, CaCo2 and GC cells (Fig. 6A).

In conclusion, in the present study, we have cloned and characterized the rat RALDH1 promoter and defined the minimal promoter region responsible for basal activity. We have demonstrated that CCAAT and Oct motifs are essential for promoter activity, and have identified two transcriptional factors, NF-YB and Oct-1, which bind to these regulatory elements. It would be of interest in the future to characterize the additional protein(s) bound to this region

of the RALDH1 promoter, and to characterize in more detail the role of NF-YB and Oct-1 in regulating RALDH1 expression during development and differentiation.

Acknowledgements

This work was supported by Canadian Institutes of Health Research grant to P.V.B. and S.M. (MOP36485).

References

- [1] C. Hofmann, G. Eichele, Retinoids in development, in: M.B. Sporn, A.B. Roberts, D.S. Goodman (Eds.), *The Retinoids: Biology, Chemistry and Medicine*, 2nd ed., Raven, New York, 1994, pp. 387–441.
- [2] M. Maden, Role of retinoids in embryonic development, in: R. Blomhoff (Ed.), *Vitamin A in Health and Disease*, Marcel Dekker, New York, 1994, pp. 289–322.
- [3] D. Rosenthal, F. Lancillotti, N. Darwiche, R. Sinha, L.M. De Luca, Regulation of epithelial differentiation by retinoids, in: R. Blomhoff (Ed.), *Vitamin A in Health and Disease*, Marcel Dekker, New York, 1994, pp. 425–450.
- [4] P. Chambon, A decade of molecular biology of retinoic acid receptors, *FASEB J.* 10 (1996) 940–954.
- [5] D.J. Mangelsdorf, K. Umeson, R.M. Evans, The retinoid receptors, in: M.B. Sporn, A.B. Roberts, D.S. Goodman (Eds.), *The Retinoids: Biology, Chemistry and Medicine*, 2nd ed., Raven, New York, 1994, pp. 319–349.
- [6] G. Duester, Families of retinoid dehydrogenases regulating vitamin A function. Production of visual pigment and retinoic acid, *Eur. J. Biochem.* 267 (2000) 4315–4324.
- [7] J. Labrecque, P.V. Bhat, A. Lacroix, Purification and partial characterization of a rat kidney aldehyde dehydrogenase that oxidizes retinal to retinoic acid, *Biochem. Cell Biol.* 71 (1993) 85–89.
- [8] P.V. Bhat, J. Labrecque, J.-M. Boutin, A. Lacroix, A. Yoshida, Cloning of a cDNA encoding rat aldehyde dehydrogenase with high activity for retinal oxidation, *Gene* 166 (1995) 303–306.
- [9] J. Labrecque, F. Dumas, A. Lacroix, P.V. Bhat, A novel isoenzyme of aldehyde dehydrogenase specifically involved in the biosynthesis of 9-*cis* and all-*trans* retinoic acid, *Biochem. J.* 305 (1995) 681–684.
- [10] P.V. Bhat, M. Marcinkiewicz, Y. Li, S. Mader, Changing patterns of renal retinal dehydrogenase expression parallel nephron development in the rat, *J. Histochem. Cytochem.* 46 (1998) 1025–1032.
- [11] P.V. Bhat, Retinal dehydrogenase gene expression in stomach and small intestine of rats during postnatal development and in vitamin A deficiency, *FEBS Lett.* 426 (1998) 260–262.
- [12] P.V. Bhat, T. Bader, P. Nettesheim, A.M. Jetten, Differentiation-dependent regulation of retinal dehydrogenase gene expression in the trachea, *Biochem. Cell Biol.* 76 (1998) 59–62.
- [13] B. Chen, A.E. Przbyla, An efficient site-directed mutagenesis method based on PCR, *BioTechniques* 17 (1994) 657–659.
- [14] F.M. Ausubel, R. Brent, R.E. Kingston, D.D. Moore, J.G. Seidman, J.A. Smith, K. Struhl, *Current Protocols in Molecular Biology*, 5th ed., Wiley, New York, 1999, pp. 9.1.1–9.2.6.
- [15] J.D. Dignam, R.M. Lebovitz, R.G. Roeder, Accurate transcription initiation by RNA polymerase II in a soluble extract from isolated mammalian nuclei, *Nucleic Acids Res.* 11 (1983) 1475–1489.
- [16] T.J. Dunn, A.J. Koleske, R. Lindahl, H.C. Pitot, Phenobarbital-induced aldehyde dehydrogenase in the rat: cDNA sequence and regulation of the mRNA by phenobarbital in responsive rats, *J. Biol. Chem.* 263 (1989) 13057–13065.
- [17] V. Montplaisir, N. Chow Lan, J. Guimond, C. Savineau, P.V. Bhat, S. Mader, Recombinant class I aldehyde dehydrogenases specific for all-*trans* or 9-*cis* retinal, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 17486–17492.

- [18] P. Rongneparut, S. Weaver, Isolation and characterization of a cytosolic aldehyde dehydrogenase-encoding cDNA from mouse liver, *Gene* 101 (1991) 261–265.
- [19] Y. Yanagawa, J.C. Chen, L.C. Hsu, A. Yoshida, The transcriptional regulation of human aldehyde dehydrogenase I gene. The structural and functional analysis of the promoter, *J. Biol. Chem.* 270 (1995) 17521–17527.
- [20] H.L. Ang, G. Duester, Initiation of retinoid signaling in primitive streak mouse embryos: spatiotemporal expression patterns of receptors and metabolic enzymes, *Dev. Dyn.* 215 (1999) 264–272.
- [21] R. Godbout, M. Packer, S. Poppema, L. Dabbagh, Localization of cytosolic aldehyde dehydrogenase in the developing chick retina: in situ hybridization and immunohistochemical analyses, *Dev. Dyn.* 205 (1996) 319–331.
- [22] P. McCaffery, M.O. Lee, M.A. Wagner, N.E. Sladek, U.C. Drager, Changing pattern of retinoic acid system in the developing retina, *Dev. Biol.* 158 (1993) 390–399.
- [23] Y. Zhai, Z. Sperkova, J.L. Napoli, Cellular expression of retinal dehydrogenase types 1 and 2: effects of vitamin A status on testis mRNA, *J. Cell. Physiol.* 186 (2001) 220–232.
- [24] G. Elizondo, J. Corchero, E. Sterneck, J. Gonzalez, Feedback inhibition of the retinaldehyde dehydrogenase gene ALDH1 by retinoic acid through retinoic acid receptor alpha and CCAAT/enhancer-binding protein beta, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 39747–39753.
- [25] R. Godbout, E.A. Monckton, Differential regulation of the aldehyde dehydrogenase 1 gene in embryonic chick retina and liver, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 32896–32904.
- [26] S.N. Maity, B.D. Crombrughe, Role of the CCAAT-binding protein CBF/NF-Y in transcription, *TIBS* 23 (1998) 174–178.
- [27] K. Matuoka, K.U. Chen, Nuclear factor Y (NF-Y) and cellular senescence, *Exp. Cell Res.* 253 (1999) 365–371.
- [28] R.A. Sturm, G. Das, W. Herr, The ubiquitous octamer-binding protein Oct-1 contains a POU domain with a homeo box subdomain, *Genes Dev.* 2 (1998) 1582–1599.
- [29] C. Fletcher, N. Heintz, R.G. Roeder, Purification and characterization of OTF-1, a transcription factor regulating cell cycle expression of a human histone H2b gene, *Cell* 51 (1987) 773–781.
- [30] F. Labella, H.L. Sive, R.G. Roeder, N. Heintz, Cell-cycle regulation of a human histone H2b gene is mediated by the H2b subtype-specific consensus element, *Genes Dev.* 2 (1988) 32–39.
- [31] S. Murphy, A. Pierani, C. Scheidereit, M. Melli, R.G. Roeder, Purified octamer binding transcription factors stimulate RNA polymerase III-mediated transcription of the 7SK RNA gene, *Cell* 59 (1989) 1071–1081.
- [32] T. Jenuwein, R. Grosschedl, Complex pattern of immunoglobulin mu gene expression in normal and transgenic mice: nonoverlapping regulatory sequences govern distinct tissue specificities, *Genes Dev.* 5 (1991) 932–943.
- [33] B.M. Fadel, S.C. Boutet, T. Quertermous, Octamer-dependent in vivo expression of the endothelial cell-specific TIE2 gene, *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 20376–20383.
- [34] J.L. Schwachtgen, J.E. Rémacle, N. Janel, R. Brys, D. Huylebroeck, D. Meyer, D. Kerbiriou-Nabias, Oct-1 is involved in the transcriptional repression of the von Willebrand factor gene promoter, *Blood* 92 (1998) 1247–1258.
- [35] S.B. Roberts, N. Segil, N. Heintz, Differential phosphorylation of the transcription factor Oct-1 during the cell cycle, *Science* 253 (1991) 1022–1026.
- [36] K.L. Wright, T.L. Moore, B.J. Vilen, A.M. Brown, J.P.-Y. Ting, Major histocompatibility complex class II-associated invariant chain gene expression is up-regulated by cooperative interactions of Sp1 and NF-Y, *J. Biol. Chem.* 270 (1995) 20978–20986.
- [37] J. Ericsson, S.M. Jackson, P.A. Edwards, Synergistic binding of sterol regulatory element-binding protein and NF-Y to the farnesyl diphosphate synthase promoter is critical for sterol-regulated expression of the gene, *J. Biol. Chem.* 271 (1996) 24359–24364.
- [38] A.J. Courey, D.A. Holtzman, S.P. Jackson, R. Tjian, Synergistic activation by the glutamine-rich domains of human transcription factor Sp1, *Cell* 59 (1989) 827–836.
- [39] P.R. Van Ginkel, K. Hsiao, H. Schjerven, P.J. Farnham, E2F-mediated growth regulation requires transcription factor cooperation, *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 18367–18374.

Cloning of monkey RALDH1 and characterization of retinoid metabolism in monkey kidney proximal tubule cells

Helene Brodeur,^{*,§} Isabelle Gagnon,^{*,§} Sylvie Mader,[†] and Pangala V. Bhat^{1,*§}

Laboratory of Nutrition and Cancer,^{*} Centre hospitalier de l'Université de Montreal-Hotel Dieu, Departments of Biochemistry[†] and Medicine,[§] Université de Montreal, Montreal, Quebec, Canada

Abstract All-*trans* and 9-*cis* retinoic acids function as ligands for retinoic acid receptors (RARs and RXRs), which are ligand-dependent transcription factors and play important roles in development and cellular differentiation. Several retinal dehydrogenases are likely to contribute to the production of all-*trans* and 9-*cis* RAs in vivo, but their respective roles in different tissues are still poorly characterized. We have previously characterized and cloned from kidney tissues the rat retinal dehydrogenase type 1 (RALDH1), which oxidizes all-*trans* and 9-*cis* retinal with high efficiency but is inactive with 13-*cis* retinal. Here we have characterized the retinal-oxidizing activity in monkey JTC12 cells, which are derived from kidney proximal tubules. In vitro assay of cell lysates revealed the presence of a NAD⁺-dependent dehydrogenase that catalyzed the oxidation of all-*trans*, 9-*cis*, and 13-*cis* retinal. Northern blot analysis of JTC12 RNAs and cloning by reverse transcription-polymerase chain reaction demonstrated expression of a monkey homolog of RALDH1. Bacterially expressed JTC12 RALDH1 catalyzed conversion of all three retinal isomers, with a higher catalytic efficiency for 9-*cis* retinal than for all-*trans* and 13-*cis* retinal. Accordingly, live JTC12 produced 9-*cis* retinoic acid more efficiently than all-*trans* retinoic acid from their respective retinal precursors. Only metabolites corresponding to the same steric conformation were formed from 9-*cis* or all-*trans* retinal, indicating a lack of detectable isomerizing activity in JTC12 cells.—Brodeur, H., I. Gagnon, S. Mader, and P. V. Bhat. Cloning of monkey RALDH1 and characterization of retinoid metabolism in monkey kidney proximal tubule cells. *J. Lipid Res.* 2003. 44: 303–313.

Supplementary key words retinoic acid • retinol • isomers • retinal dehydrogenase type I • retinoid metabolism

Retinoids are important regulators of cell growth, differentiation, and embryonic development (1–3). They are also needed for normal vision, reproduction, and immu-

nity (4–6). The biological actions of retinoids are mediated through binding and modulation of retinoic acid receptors (RARs) or retinoid X receptors (RXRs), which function as ligand-dependent transcription factors (7). All-*trans* retinoic acid (RA) is a natural ligand for RARs, and 9-*cis* RA binds to both RARs and RXRs (8). The influence of vitamin A (retinol) in the control of gene expression is made possible by enzymes regulating RA synthesis. RA is formed from retinol via a 2-step metabolic pathway that involves oxidation of retinol to retinal and then of retinal to RA (9, 10). Although the metabolic pathways leading to the formation of all-*trans* and 9-*cis* RAs are beginning to be elucidated, the enzymes controlling production of these compounds within specific cells and tissues are still poorly characterized. In particular, it is not firmly established whether both all-*trans* and 9-*cis* RAs can be produced from the precursor all-*trans* retinol. Several studies have shown that externally supplied all-*trans*, 9-*cis*, and 13-*cis* RAs are isomerized into *cis* or *trans* RAs in cells and tissues and appear to reach equilibrium (11–16). Since no isomerase(s) involved in these processes have been identified, it is generally believed that the interconversion of *cis-trans* RA occurs in cells through nonenzymatic mechanism(s), although it is not clear whether this can happen at the level of retinol, retinal, and/or retinoic acid (16, 17).

We have previously reported the purification, cloning, and characterization of a retinal dehydrogenase type 1 (RALDH1) from rat kidney that oxidized all-*trans* and 9-*cis* retinal, but not 13-*cis* retinal to the corresponding acids (18–20). We have also demonstrated that rat RALDH1 is highly expressed in the proximal tubules of the developing kidney,

Abbreviations: ALDH, aldehyde dehydrogenase; GST, glutathione-S-transferase; HPLC, high-pressure liquid chromatography; RA, retinoic acid; RALDH1, 2, and 3, retinal dehydrogenase type 1, 2, 3; RAR, retinoic acid receptor; RXR, retinoid X receptor; RT-PCR, reverse transcription-polymerase chain reaction; SDS-PAGE, sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis.

¹ To whom correspondence should be addressed.
e-mail: [REDACTED]

Manuscript received 6 September 2002 and in revised form 29 October 2002.

Published, JLR Papers in Press, November 4, 2002.
DOI 10.1194/jlr.M200359JLR200

Copyright © 2003 by Lipid Research, Inc.
This article is available online at <http://www.jlr.org>

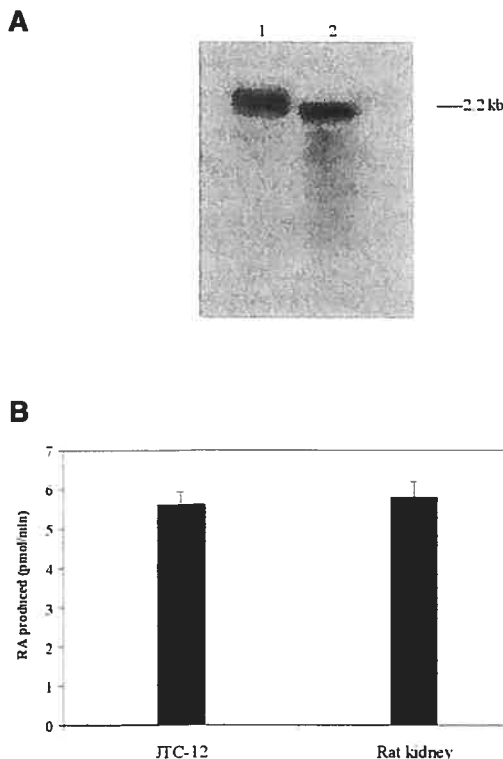


Fig. 1. A: Northern analysis of total RNA (10 µg) from JTC12 cells (lane 1) and adult rat kidney (lane 2). The blot was hybridized under low stringent conditions as described in Materials and Methods. B: Retinal-oxidizing activity in extracts from JTC12 cells and adult rat kidney. Seventy-five micrograms of crude protein extract and 10 µM of all-*trans* retinal were used in the assay.

suggesting a role in RA production during tubulogenesis (21). In addition, rat RALDH1 is expressed in other tissues such as trachea, intestine, and stomach epithelia, indicating its role in RA production needed for epithelial cell differentiation (22, 23). In humans, RALDH1 is highly expressed in kidney and liver tissues (24). On the other hand, in the mouse, RALDH1 is detected in mesonephros of 10-day-old embryo but is not expressed in the adult kidney (25).

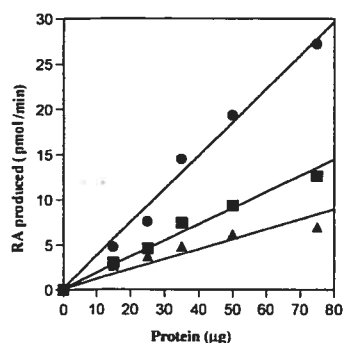


Fig. 2. Rates of retinoic acid (RA) synthesis from 9-*cis* (circle), all-*trans* (square), or 13-*cis* (triangle) retinal with increasing protein concentrations. Various concentrations of crude protein extract from JTC12 cells were incubated with 10 µM of retinal isomers at 25°C for 1 h. Each point in the curve represents the average of triplicate values.

In the present report, we have characterized the RALDH expressed in a monkey kidney cell line (JTC12) and investigated the production of isomers of RA by these cells. The enzyme cloned was found to be the most homologous to human RALDH1. Its expression in kidney JTC12 cells is consistent with the reported high expression of rat RALDH1 in kidney. In addition, monkey RALDH catalyzed formation of all-*trans*, 9-*cis*, or 13-*cis* isomers of RA from the corresponding retinal isomers in vitro, with a 2-fold higher catalytic efficiency for 9-*cis* retinal. Similarly, 9-*cis* RA was formed more efficiently than all-*trans* RA when JTC12 cells were incubated with all-*trans* or 9-*cis* retinal, respectively, without detectable equilibrium between RA isomers.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals and reagents

All-*trans*, 9-*cis*, and 13-*cis* retinal, and all-*trans* and 13-*cis* RAs were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). Standard all-*trans*, 9-*cis*, and 13-*cis* retinol were synthesized from corresponding retinal by NaBH₄ reduction as described earlier (26). 9-*cis* RA was obtained from Hoffmann-La Roche (Basel, Switzerland). The purity of the retinal substrates was assessed by reverse and normal phase high-pressure liquid chromatography (HPLC) (27) and was found to be at least 99% pure. All HPLC-grade solvents were purchased from the Fisher Scientific Co. (Toronto, Ontario).

Cell culture

JTC12 (monkey kidney proximal tubule) cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (Gibco BRL) supplemented with 10% (v/v) fetal bovine serum, high glucose, and antibiotics penicillin and streptomycin (Sigma) at 37°C in an incubator containing 5% CO₂.

Northern blot analysis

Expression of RALDH transcripts in JTC12 cells was analyzed by Northern blot essentially as described earlier (22). Total RNAs from cells were isolated with Trizol pure reagent (Gibco BRL) according to the manufacturer's protocol. Ten to fifteen micrograms of total RNA were separated in 1.1% agarose gels and transferred to a Nytran membrane. The blots were prehybridized and hybridized at 68°C using Quickhyb reagent (Stratagene, La Jolla, CA). They were then washed twice with 2× SSC, 0.1% SDS at room temperature for 15 min, and then with 0.1× SSC, 0.1% SDS at 50°C for 30 min (low-stringent condition). Under high-stringent conditions, the blots were washed with 0.1× SSC, 0.1% SDS at 65°C for 30 min. Full-length rat kidney RALDH cDNA that was labeled with [³²P]dCTP served as a probe.

Immunoblot analysis

For immunoblot analysis, cells and tissues were homogenized in 1.0 ml of 100 mM ice-cold Tris-HCl buffer, pH 8.0, containing 3 mM EDTA and a mixture of protease inhibitors. The homogenate was centrifuged at 10,000 *g* to remove debris and unhomogenized materials. The protein present in the supernatant was boiled in sample buffer, separated by 8% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), and transferred to Hybond nitrocellulose (Amersham). Blots were blocked with 0.05% Tween-20 in 5% BSA before incubation with an antibody. Immunoreactive protein was detected in an ECL Western blotting system. An antibody raised against rat RALDH1 (peptide

1	ATGTCATCCTCAGGCACGTGACACTTACCTGTCTTACCTACCGATTGAGATTCAATAT	20
	M S S S G T S D L P V L P T D L K I Q Y	
61	ACTAAGATCTTCATAAACAATGAATGGCATGATTTCAGTGAGTGGCAAGAAATTCCTGTG	40
	T K I F I N N E W H D S V S G K K F P V	
121	TTTAATCCTGCAACTGAGGAGGAGCTCTGCCAGGTAGAGAAGGAGATAAGGCAGATGTT	60
	F N P A T E E E L C Q V E E G D K A D V	
181	GACAAGGCAGTGAAGGCTGCAAGACAGGCTTCCAGATTGGATCTCCATGGCGTACTATG	80
	D K A V K A A R Q A F Q I G S P W R T M	
241	GATGCTTCTGAGAGGGGACGAC TATTATACAAGTTGGCTGATTAAATCGAAAGATCGT	100
	D A S E R G R L L Y K L A D L I E R D R	
301	CTGCTCCTGGCGACAATGGAGTCAATGAATGGTGGAAACTCTATTCCAATGCATATCTG	120
	L L L A T M E S M N G G K L Y S N A Y L	
361	AATGATTTAGCAGGCTGCATCAAAACAT TGCCTACTGTGCAGGTTGGGCTGACAAGATC	140
	N D L A G C I K T L R Y C A G W A D K I	
421	AGGGCCGTACAATACCAATTGATGGAAACTTTTACATATACAAGACATGAACCTATT	160
	Q G R T I P I D G N F F T Y T R H E P I	
481	GGTGTATGTGGCCAAATCATTCCTTGGAAATTTCCCGTTGGTTATGCTCATTGGAGATA	180
	G V C G Q I I P W N F P L V M L I W K I	
541	GGGCTGCACTGAGCTGTGGAAACACAGTGGTTGTCAAACAGCAGACGCAAACTCCTCTC	200
	G P A L S C G N T V V V K P A E Q T P L	
601	ACTGCCCTCCACGTGGCATCTT TAATAAAGAGGCAGGGTTTCTCTGGAGTAGTGAAT	220
	T A L H V A S L I K E A G F P P G V V N	
661	ATTGTTCTGGTTATGGGCTTACAGCAGGGCAGCCATTTCTTCCACATGGATATAGAC	240
	I V P G Y G P T A G A A I S S H M D I D	
721	AAAGTAGCCTTACAGGATCGACAGAGTTCGGCAAGTTGATCAAAGAAGCTGCGGGGAAA	260
	K V A F T G S T E V G K L I K E A A G K	
781	AGCAATCTGAAGAGGGTGACTC TGGAGC TGGGAGGAAAGAGCCCTTGCAATGTGTAGCT	280
	S N L K R V T L E L G G K S P C I V L A	
841	GATGCTGACTTGGACAATGCTGTTGAAT TTGCACACCATGGGGTGTCTACCAACAGGGC	300
	D A D L D N A V E F A H H G V F Y H Q G	
901	CAGTGTGTATAGCCGCATCCAGGATTTTGTGGAAGAATCAATTTATGACGAGTTGT	320
	Q C C I A A S R I F V E E S I Y D E F V	
961	CGAAGGAGTGTGAGCGGGCTAAGAAGTATATCTTGGAAATCTCTGACCCAGGAGCT	340
	R R S V E R A K K Y I L G N P L T P G A	
1021	ACTCAAGGCCCTCAGATTGACAAGGAACAATATGATAAAATAC TTGAOCTCATTGAGAT	360
	T Q G F Q I D K E Q Y D K I L D L I E S	
1081	GGGAAGAAAGAGGGGCCAAAC TGAATGTGGAGGAGGCCCGTGGGGGAATAAAGGCTAT	380
	G K K E G A K L E C G G G P W G N K G Y	
1141	TTTGTCCAGCCCAGGTGTCTCTAATGTTACAGATGAGATGCGCATTGCCAAAGAGGAG	400
	F V Q P T V F S N V T D E M R I A K E E	
1201	ATTTTGGACAGTGCAGCAAA TCATGAAGTTTAAATCTTTAGATGACGTGATCAAAAGA	420
	I F G P V Q Q I M K F K S L D D V I K R	
1261	GCAACAATACTTTCTATGGCTTATCGGCAGGAGTCTTTACCAATGACATTGATAAAGCC	440
	A N N T F Y G L S A G V F T N D I D K A	
1321	GTAACATCTCCTCTGCTCTGCAAGCAGGAACAGTGTGGGTGAATTGCTATGGCGTGGTA	460
	V T I S S A L Q A G T V W V N C Y G V V	
1381	ACTGCCAGTGTCCCTTTGGTGGATTCAAGATGTCTGGAATGGACGAGAACTGGGAGAG	480
	T A Q C F F G G F K M S G N G R E L G E	
1441	TACGGTTTCCATGAATACACAGAGGTCAAACAGTCACGGTGAATCTCTCAGAGAAC	500
	Y G F H E Y T E V K T V T V K I S Q K N	
1501	TCATAA	
	S *	

Fig. 3. Nucleotide and deduced amino acid sequences of the monkey retinal dehydrogenase type 1 (RALDH1) open reading frame. The amino acids that are different from human aldehyde dehydrogenase (ALDH)1 are indicated in bold. Sequence data have been deposited with the GenBank accession number AF542418.

corresponding to residues 5–16) (28) (kindly supplied by Dr. James Lipsky, Mayo Clinic Foundation, Rochester, MN) was used in immunoblot analysis.

Cloning of cDNA

Monkey RALDH1 cDNA was cloned from JTC12 total RNA by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). The primers from human RALDH1 sequence were used in RT-PCR (29). The forward and reverse primers consist of the *Bam*HI restriction site and 5'-sequences (oligos 1–20, atgtcatctcag-gcacgcc), and an *Eco*RI restriction site and the reverse complement of 3'-sequences (oligos 1487–1506, ctctcagaagaactcataa) respectively. First strand cDNA was synthesized with 2 µg of RNA from JTC12 cells using M-MLV reverse transcriptase (Gibco BRL) and 3'-primer. This was followed by a PCR that contained

both 5'- and 3'-primers and Taq polymerase using Super Script system (Gibco BRL). The PCR product was separated on 1% agarose gel, and a 1.5-kb band was isolated on DE 81 paper. The 1.5-kb PCR product that contained the RALDH open reading frame was subcloned into the *Bam*HI and *Eco*RI sites of the pGEX-2T bacterial expression vector (Pharmacia Biotech). Two clones originating from independent PCR reactions were sequenced.

Recombinant RALDH expression and purification

The RALDH1 clone in pGEX-2T vector was transformed into *Escherichia coli* BL21 (DE3) and expressed with glutathione-S-transferase (GST) fusion protein at the N terminus. The expressed protein was purified from crude bacterial extract with a GST affinity column followed by excision with thrombin as described previously (30). The purity of the enzyme was assessed by SDS-PAGE.

moRALDH1	MSSSGTSDLP	VLPTDLKIQY	TKIFINNEWH	DSVSGKKFPV	FNPAEEEEELC	50
hALDH1	-----P-----	-----L-----	-----	-----	-----	
rRALDH1	---PAQPAV---	APLAN-----H	-----	-----	L-----VI-	
mRALDH1	---PAQPAV---	APLA-----H	-----	N-----	L-----VI-	
moRALDH1	QVEEGDKADV	DKAVKAARQA	FQIGSPWRTM	DASERGRLLY	KLADLIERDR	100
hALDH1	-----E-----	-----	-----	-----	-----	
rRALDH1	H-----	-----	-----	-----N	-----M----	
mRALDH1	H-----	-----	-----	-----N	-----M----	
moRALDH1	LLLATMESMN	GKGLYSNAYL	NDLAGCIKTL	RYCAGWADKI	QGRTPIDGN	150
hALDH1	-----	-----	-----	-----	-----	
rRALDH1	-----I-AI-	---VFA----	S--G-S--A-	K-----	H-Q---S--D	
mRALDH1	-----AL-	---VFA----	S--G---A-	K-----	H-Q---S--D	
moRALDH1	FFTYTRHEPI	GVCQIIPWN	FPLVMLIWKI	GPALSCGNTV	VVKPAEQTPL	200
hALDH1	-----	-----	-----	-----	-----	
rRALDH1	I--F--R--	-----	---L-F----	-----	-----	
mRALDH1	I----R--	-----	--ML-F----	-----	-----	
moRALDH1	TALHVASLIK	EAGFPPGVVN	IVPGYGPTAG	AAISSHMDID	KVAFTGSTEV	250
hALDH1	-----	-----	-----	-----	-----	
rRALDH1	---M-----	-----	-----	-----V-	-----Q-	
mRALDH1	---L-----	-----	-----	-----V-	-----Q-	
moRALDH1	GKLIKEAAGK	SNLKRVTLEL	GGKSPCIVLA	DADLDNAVEF	AHHGVFYHQG	300
hALDH1	-----	-----	-----	-----	-----	
rRALDH1	-----	-----	-----F-	-----I----	-----	
mRALDH1	-----	-----	-----F-	-----I----	-----	
moRALDH1	QCCIAASRIF	VEESYDEFV	RRSVERAKKY	ILGNPLTPGA	TQGPQIDKEQ	350
hALDH1	-----	-----	-----	-----V	-----	
rRALDH1	--V-----	---V-----	-K-----	V-----Q-I	N-----	
mRALDH1	--V-----	---V-----	K-----	V-----I	N-----	
moRALDH1	YDKILDIES	GKKEGAKLEC	GGGFWGNKGY	FVQPTVFSNV	TDEMRIAKEE	400
hALDH1	-----	-----	-----	-----	-----	
rRALDH1	H-----	-----	---R-----F	-----	-----	
mRALDH1	H-----	-----	---R-----F	-----	-----	
moRALDH1	IFGPVQQIMK	FKSLDDVIKR	ANNTFYGLSA	GVFTNDIDKA	VTISSALQAG	450
hALDH1	-----	-----	-----	---K-----	I-----	
rRALDH1	-----	---I-----	---T---A-	---K-L-R-	I-V-----	
mRALDH1	-----	---V-----	---T---A-	-L--K-L--	I-V-----	
moRALDH1	TVWVNCYGVV	TAQCPFPGFK	MSGNGRELGE	YGFHEYTEVK	TVTVKISQKN	500
hALDH1	-----	S-----	-----	-----	-----	
rRALDH1	V-----MIL	S-----	-----	H-LY---L-	--AM-----	
mRALDH1	V-----IML	S-----	-----	H-LY---L-	--AM-----	
moRALDH1	S					
hALDH1	-					
rRALDH1	-					
mRALDH1	-					

Fig. 4. Comparison of amino acid sequences of monkey RALDH1 (moRALDH1) with other ALDH family members. Sequence identity between ALDHs is indicated by dashes. hALDH1, rRALDH1, and mRALDH1 represent human, rat, and mouse RALDHs, respectively. Sequences were obtained from GenBank accession numbers: hALDH1 NM000689, rRALDH1 L42009, and mRALDH1 NM 013467.

RALDH activity assays

Assays for monkey RALDH1 activity were carried out essentially as described previously for rat kidney RALDH1 (31). Cell lysates or tissue extracts were incubated for 60 min at 25°C with an assay mixture (250 μ l) containing 10 μ M each of all-*trans*, 9-*cis*, or 13-*cis* retinal (added in 2.5 μ l dimethyl sulfoxide), and 603 μ M NAD⁺ in 100 mM phosphate buffer, pH 7.5, containing 0.02% Tween-80 and 161 mM dithiothreitol. To determine the kinetic constants of purified recombinant RALDH, various concentrations of retinal substrates (1–20 μ M) were incubated with a fixed amount of enzyme. Immediately after the reactions, the assay mixture was extracted with 400 μ l of butanol-acetonitrile (1:1, v/v), and the reaction product was analyzed by HPLC. Assays were performed under yellow light or in minimal light to minimize the photoisomerization of retinoids.

Retinoid metabolism by JTC12 cells

Cells at least 70% confluent were used in retinoid metabolism studies. In cytotoxic assays and titration experiments, 2.5 million cells in 10 cm dishes were incubated with 1 μ M, 5 μ M, or 10 μ M all-*trans* retinal for 24 h. In later experiments, cells were incubated for 3 h with 10 μ M all-*trans*, 9-*cis*, or 13-*cis* retinal. Retinoids were freshly prepared in ethanol, and their purity was checked by UV spectrum and HPLC before their addition to the medium. Formalin-fixed cells served for control incubations with retinoids. After incubations with retinoids, the medium was removed and the cells were washed twice with cold phosphate-buffered saline (PBS). They were then collected from the dish by scraping, and suspended in 0.5 ml PBS. Cell lysates were prepared by freezing and thawing three times. After gently vortexing for a few seconds, the samples were centrifuged at 2,000 rpm for 15 min at

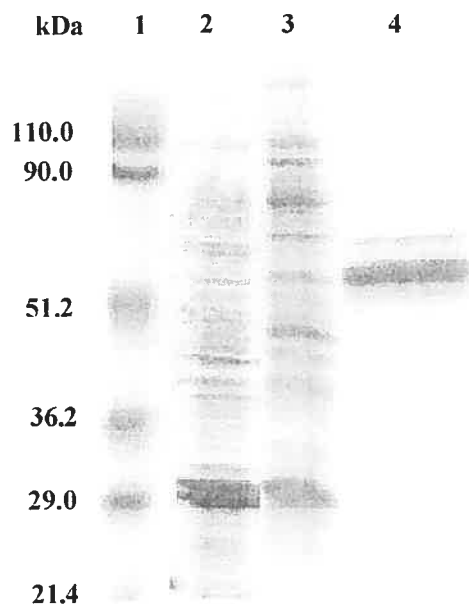


Fig. 5. Expression of monkey RALDH1 in *E. coli*. Lane 1, molecular weight markers; lane 2, bacterial lysate transfected with the empty vector; lanes 3 and 4, whole bacterial extracts from BL21 (DE3) cells transformed with the pGEX-2T-RALDH1 expression vector and purified enzyme by glutathion-Sepharose followed by excision with thrombin respectively. Proteins (6 μ g) were loaded on an SDS-polyacrylamide gel (10%) and visualized by 0.05% Coomassie Brilliant blue.

4°C to remove cell debris, and supernatants were collected. Retinal, retinol, and RA were extracted from the cell lysates (250 μ l) with butanol-acetonitrile (400 μ l, 1:1). An aliquot was directly injected onto HPLC for the separation and quantification of retinoids. To detect the formation of retinyl esters, the lysates were extracted twice with 3 ml of petroleum ether. Retinyl esters were separated by alumina column chromatography as described earlier (32), and their identities were verified by spectrophotometry and HPLC (33).

HPLC analysis

RA, retinol, and retinal were separated on a 4.6 \times 250 mm Partisil 10 μ ODS (irregular shaped, 10% carbon loading from Phenomenex, Inc., Torrance, CA) with acetonitrile-water (40:60, v/v) containing 10 mM ammonium acetate as the mobile phase and at a flow rate of 1.2 ml/min. In this HPLC system, *cis*-retinoids are not separated from each other but are separated from their respective *trans*-retinoids. The identity of each *cis*-retinoid isomer (9-*cis* and 13-*cis*) and the formation of retinyl esters were studied in other HPLC systems described earlier (33, 34). Retinoids were detected by absorbance at 330 nm on a Shimadzu LC-7A liquid chromatography system. Retinoid peaks were identified and quantified by comparing their retention times and integrated areas under the peak against those of known amounts of pure standard retinoids.

RESULTS

Characterization of the RALDH expressed in JTC12 cells

Northern blot analysis of RNA extracted from JTC12 cells under low-stringency conditions using full-length rat kidney RALDH1 cDNA as a probe revealed an abundant \sim 2.2 kb transcript (Fig. 1A). The size of the transcript was slightly higher than that of rat kidney RALDH1 (Fig. 1A, lane 2). However, under high-stringency conditions, the probe hybridized with rat RALDH1 but not with the transcript from JTC12 cells, suggesting differences in primary sequences between the two mRNAs. Western blot analysis using anti-rat RALDH1 showed no signal (data not presented), indicating that the peptide sequence of JTC12 ALDH differs from that of rat RALDH1 between amino acids 5–16, the epitope recognized by the antibody. Note, however, that this antibody does not recognize human RALDH1, due to sequence divergence in this epitope. We next examined whether the JTC12 ALDH transcript hybridizes with other cytosolic ALDHs, such as RALDH2 and RALDH3, which also catalyze retinal oxidation (30, 35). A cDNA probe corresponding to mouse RALDH2 did not

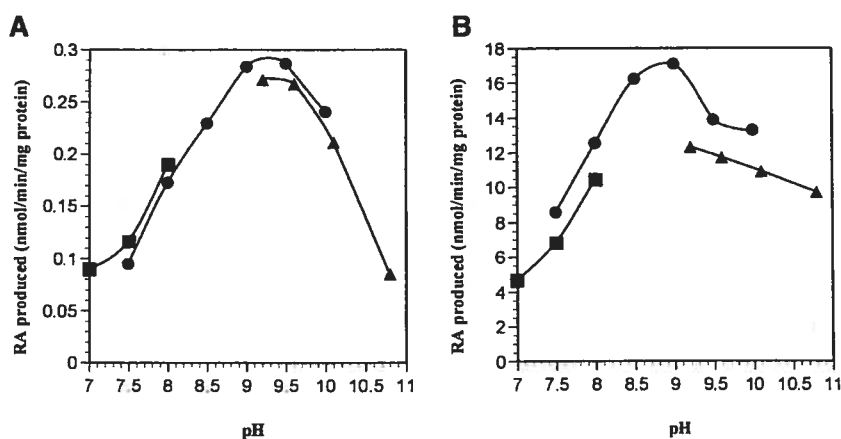


Fig. 6. The pH optimum for all-*trans* RA synthesis is similar for native and recombinant monkey RALDH1. Thirty-five micrograms and 0.6 μ g respectively of crude extract (A) and pure recombinant proteins (B) were used in the assay. The reaction was performed with 10 μ M of all-*trans* retinal. Each point is the average of triplicate values. Square, phosphate buffer 0.1 mM, pH 7–8; circle, Tris-HCl buffer 0.1 mM, pH 7.5–9.0; triangle, bicarbonate buffer 0.1 mM, pH 9–11.

hybridize, and a mouse RALDH3 probe recognized only a faint doublet around 3 kb (data not presented), suggesting that the main ALDH found in JTC12 cells is the monkey homolog of the RALDH1.

To test whether the JTC12 ALDH has activity with retinal substrates, we performed retinal dehydrogenase assays in crude cell extracts, using initially all-*trans* retinal as substrate. Similar to rat kidney extracts, the JTC12 cell extracts showed high NAD-dependent RA-synthesizing activity (Fig. 1B). The ability of JTC12 cell extracts to catalyze the oxidation of all-*trans*, 9-*cis*, and 13-*cis* retinal was examined to compare the substrate selectivity of the RALDH expressed in these cells with those reported for human, mouse, or rat RALDH1. While all three enzymes catalyze oxidation of all-*trans* and 9-*cis* retinal, they differ in their properties with 13-*cis* retinal, which is a substrate only for human RALDH1. The rates of RA production using JTC12 cell extracts were linear to protein concentrations up to 75 μ g. The RALDH present in these extracts had high activity with 9-*cis* retinal, and slightly lower activity with all-*trans* and 13-*cis* retinal (Fig. 2). Thus, the substrate selectivity of the JTC12 RALDH with 13-*cis* retinal is closer to that of the human enzyme than to those of the rodent enzymes.

Together, the results of the Northern/Western experiments and of the enzymatic assays suggest that the RALDH expressed in JTC12 cells is most closely related to human RALDH1 (19, 36).

Kinetic properties of the recombinant JTC12 RALDH

Since the initial characterization of the JTC12 RALDH indicated high similarity with human RALDH1, we used 5'- and 3'-primers derived from human ALDH1 in a RT-PCR assay to clone the cDNA corresponding to the monkey enzyme. The cDNA obtained encoded a deduced protein of 500 amino acids (Fig. 3) with closest amino acid identity with human ALDH1 (98.6%) (29). Monkey RALDH1 also shared 85.6% and 86.2% amino acid identity with rat and mouse RALDH1, respectively (Fig. 4). Note that 9 amino acids out of 12 differ between monkey RALDH1 and rat RALDH1 in the N-terminal epitope recognized by the antibody used in Western blotting, explaining its lack of cross-reactivity with JTC12 extracts.

To investigate whether the cloned cDNA expresses a protein with enzymatic properties for retinal oxidation similar to those observed with crude extracts, we expressed it in an *E. coli* system. The purified recombinant enzyme showed an expected molecular mass of 55 kDa (Fig. 5). The pH optimum of the expressed enzyme for all-*trans* retinal oxidation was nine (Fig. 6B), similar to the pH optimum of the enzyme characterized in crude extracts (Fig. 6A). Next, we tested the activity of recombinant RALDH for retinal isomer substrates. Similarly to the activity observed in crude cell extracts (Fig. 2), the *E. coli*-expressed enzyme also catalyzed oxidation of the three retinal isomer substrates to the respective RAs (data not presented).

To test whether the kinetic properties of recombinant JTC12 RALDH for retinal substrates are similar to those of

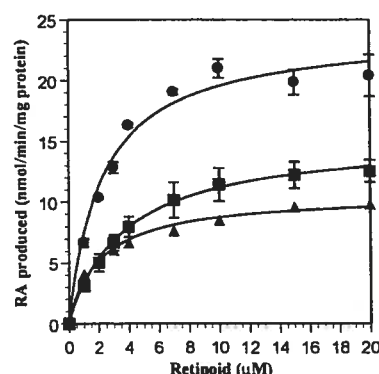


Fig. 7. Saturation kinetics of recombinant monkey RALDH1 for retinal isomers. Assays were performed with 0.4 μ g of recombinant protein. Circle, 9-*cis*; square, all-*trans*; and triangle, 13-*cis* retinal. Each point in the curves represents the average of three replicates.

human ALDH1 (36), we assessed its saturation kinetics with all-*trans*, 9-*cis*, and 13-*cis* retinal. The recombinant enzyme exhibited the highest activity for 9-*cis* retinal followed by all-*trans* and 13-*cis* retinal oxidation (Fig. 7). The K_m for 13-*cis* retinal was 2-fold lower than for all-*trans* retinal. However, no significant difference was observed in the catalytic efficiency (V_{max}/K_m) of 13-*cis* and all-*trans* retinal conversion to the respective RAs (Table 1). On the other hand, 9-*cis* retinal showed \sim 2-fold higher catalytic efficiency when compared with all-*trans* retinal oxidation. Overall, the kinetic properties were similar to those of purified human ALDH1 (36).

Metabolism of retinal isomers by JTC12 cells

The presence of trace amounts of retinal, the intermediate in the synthesis of RA from retinol, has been demonstrated in tissues (37). However, little is known about whether stereochemical integrity is maintained in cells during RA metabolism. Since JTC12 cells express high levels of an RALDH that is capable of oxidizing all-*trans*, 9-*cis*, and 13-*cis* retinal, metabolic studies performed with these cells should provide valuable information as to the possibility of intracellular conversion between retinal isomers.

In initial experiments, JTC12 cells were incubated for 24 h with various concentrations of all-*trans* retinal (1–10 μ M) to assess the sensitivity of the HPLC assay for detection of RA produced, and the potential toxicity of the retinal substrate. Cell viability was examined by trypan blue

TABLE 1. Substrate specificities of recombinant RALDH of JTC12 cells for retinal isomers

Retinal isomers	K_m	V_{max}	V_{max}/K_m
	μ M	nmol/min/mg	
All- <i>trans</i>	3.21	14.08	4.49
9- <i>cis</i>	2.63	24.15	9.19
13- <i>cis</i>	1.51	9.35	6.22

cDNA for RALDH was isolated from JTC12 cells and expressed in *E. coli*. The recombinant protein was purified as described in Materials and Methods. The kinetic constants represent the average of two or more independent determinations where each point in the curve of each experiment is the average of three replicates.

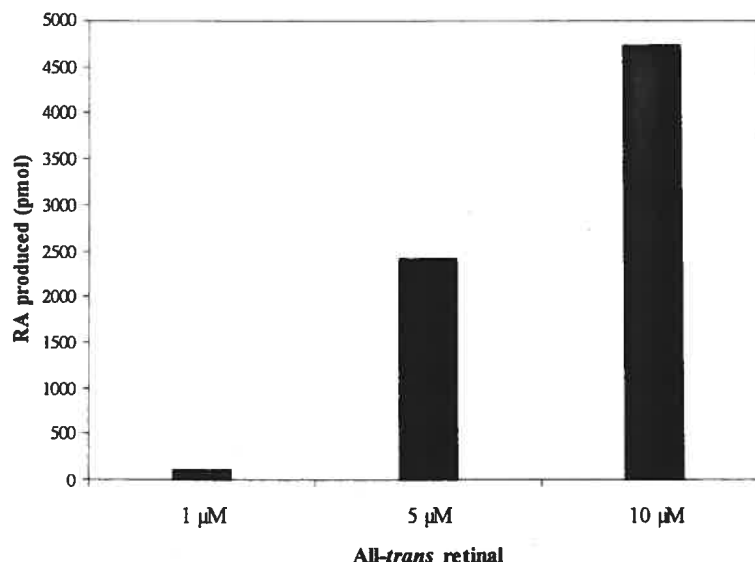


Fig. 8. Levels of RA synthesized in JTC12 cells incubated with various concentrations of all-*trans* retinal. All-*trans* retinal was added to the culture medium in 5 μ l (0.1% final concentration in medium) ethanol and incubated for 24 h. RA was extracted from the cells and analyzed by high-pressure liquid chromatography (HPLC) as described in Materials and Methods.

exclusion and indicated that the retinal concentrations used were not toxic. Since a dose-dependent increase in RA levels was observed in this range of concentrations (Fig. 8), more detailed metabolic studies were then performed in JTC12 cells using 10 μ M of retinal isomers. The purity of all-*trans*, 9-*cis*, and 13-*cis* retinal substrates before incubation was found to be greater than 99% by HPLC analysis (Fig. 9A, B, C, respectively). All retinoid-containing solutions were prepared in the dark just before incubation. The typical HPLC profiles of the lipid extracts from cells incubated with all-*trans*, 9-*cis*, or 13-*cis* retinal for 3 h are presented in Fig. 9D, E, and F, respectively. The cells took up all-*trans* retinal from the medium and converted it into either all-*trans* retinol or all-*trans* RA (Fig. 9D, peaks 2 and 4), while no *cis* isomers of retinol or RA were detected. Interestingly, we did not detect retinal in cell extracts, indicative of its complete metabolism. Similarly, 3 h of incubation with 9-*cis* retinal resulted in the formation of 9-*cis* RA by the cells (Fig. 9E, peak 1), and neither all-*trans* RA nor all-*trans* retinal were produced. Note that 9-*cis* retinol was not detected either. In parallel experiments, cells pre-treated with formaldehyde for 1 min (dead cells) did not produce any metabolites of all-*trans* or 9-*cis* retinal, indicating that metabolites were formed in the cells. On the other hand, the metabolic profile of 13-*cis* retinal showed formation of all-*trans* RA, all-*trans* retinol, and all-*trans* retinal with no 13-*cis* RA or 13-*cis* retinol (Fig. 9F), while trace amounts of 13-*cis* retinal were still present in the cells (Fig. 9F, peak 7). Since mainly all-*trans* retinoid metabolites were present in cells incubated with 13-*cis* retinal, one possibility is that most of the 13-*cis* retinal might have been isomerized nonspecifically in the medium to all-*trans* retinal, and that all-*trans* retinal might have been preferentially taken up by the cells and metabo-

lized to the respective RA or retinol. To explore this possibility, we incubated formalin-fixed cells with 13-*cis* retinal and analyzed the retinoids extracted from the medium. Indeed, more than 45% of 13-*cis* retinal was isomerized to all-*trans* retinal in the medium at 3 h of incubation (data not shown). At present, we have not succeeded in keeping the integrity of the steric configuration of 13-*cis* retinal in the incubation medium, thus preventing assessment of the metabolism of 13-*cis* retinal in JTC12.

Although the presence of retinyl esters was not routinely examined because of the need to use relatively tedious chromatographic systems to separate and quantify the isomers of retinyl esters, alumina chromatography and HPLC analysis demonstrated the presence of retinyl esters in cells incubated with all three retinal isomers (data not shown), indicating that JTC12 cells express retinyl esterases and store retinol in the form of retinyl esters.

The levels of all-*trans* or 9-*cis* RA or retinol formed in cells incubated for 3 h with all-*trans* or 9-*cis* retinal, respectively, is illustrated in Fig. 10. At 3 h of incubation, the cellular levels of 9-*cis* RA were 5-fold higher than of all-*trans* RA, while all-*trans* retinol accumulated more than 9-*cis* retinol over the same time period. This higher efficiency in the conversion of 9-*cis* retinal to RA than of the all-*trans* isomer is consistent with the *in vitro* properties of the monkey RALDH1.

DISCUSSION

Although a wealth of information is available on the role of retinoid receptors in retinoid signaling, less is known about the metabolic pathways involved in the biosynthesis of RA isomers in target tissues. To analyze the

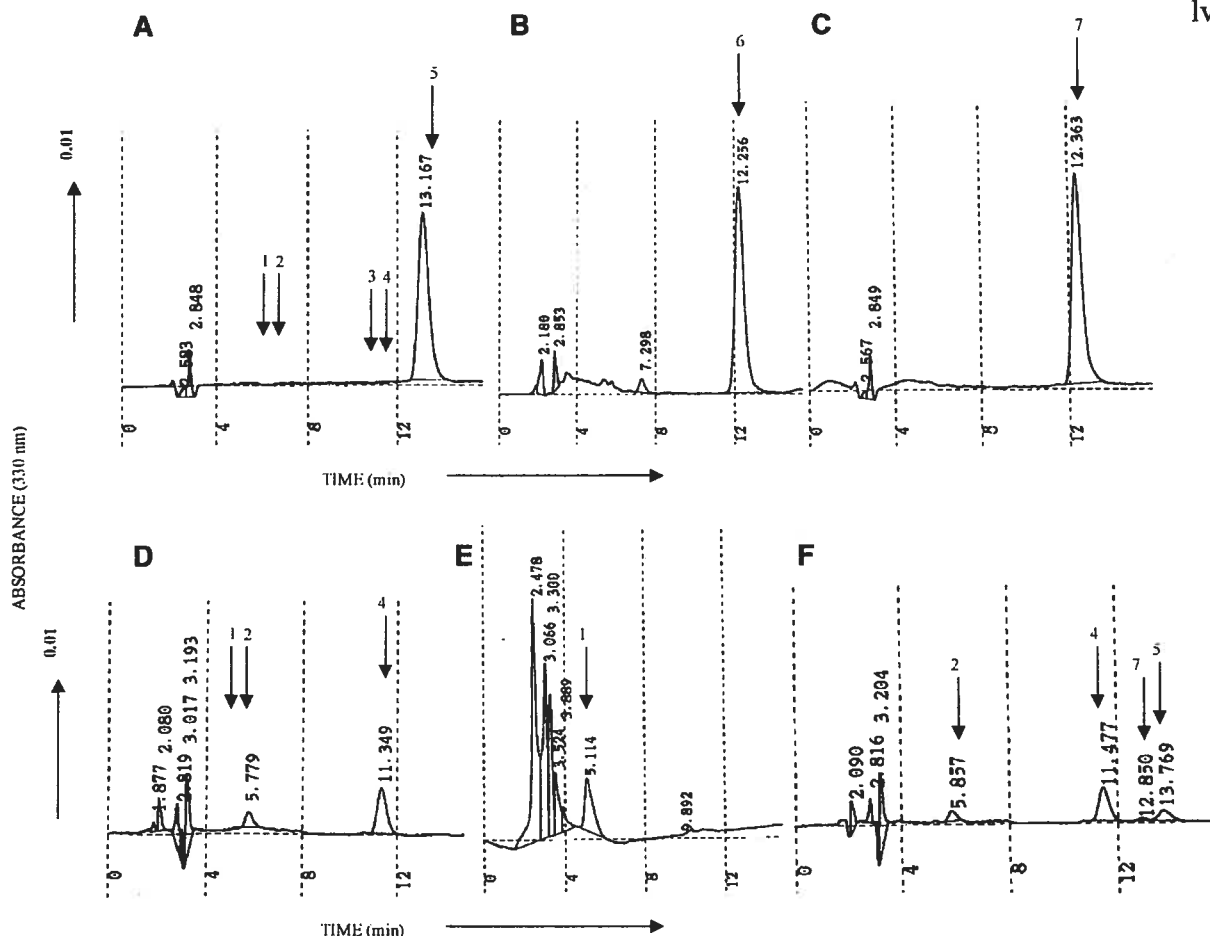


Fig. 9. Representative HPLC chromatograms of standard retinal isomers (upper panel) and their metabolites generated in JTC12 cells (lower panel). Arrows 5, 6, and 7 indicate the elution positions as well as the purity of the all-*trans* (A), 9-*cis* (B), and 13-*cis* (C) retinal standards that were used in the metabolic studies. D–F: Represent the metabolic profiles of cells incubated with all-*trans*, 9-*cis*, and 13-*cis* retinal for 3 h, respectively. Arrow 1 represents the elution position of 9-*cis* and 13-*cis* RA; 2, all-*trans* RA; 3, 9-*cis* and 13-*cis* retinol; and 4, all-*trans* retinol.

biosynthetic pathways of retinoid isomers in an intact cell system, we characterized the RA synthetic enzyme expressed in a kidney-derived cell line, JTC12. The expression levels and activity for the three retinal isomers of the RALDH enzyme expressed in JTC12 cells suggested that JTC12 is a good model to explore the biosynthesis of RA isomers in a cellular environment.

We have previously reported the kinetic properties of several RALDHs for retinal isomer substrates (19, 30, 36), and characterized the amino acid regions that are important for all-*trans* and 9-*cis* retinal oxidation (38). The observation that the JTC12 RALDH activity catalyzed the oxidation of the three retinal isomer substrates (Fig. 2), and the lack of hybridization with a probe for RALDH2, which also oxidizes the three retinal isomers (30), indicated that this activity is most similar to human ALDH1 (36). This homology was confirmed by sequencing of the cloned cDNA (Fig. 3), and the properties of the recombinant enzyme, such as molecular mass (Fig. 5), pH optimum (Fig. 6), and kinetic constants (Fig. 7, Table 1), were found to be very similar to those of human ALDH1 (36). Furthermore, the transcript (~2.2 kb) that hybridized with rat

kidney RALDH1 cDNA at low stringency (Fig. 1) hybridized strongly with the cloned cDNA under high-stringency conditions (data not shown), confirming that the cloned monkey RALDH1 is indeed the retinal dehydrogenase expressed to high levels in JTC12 cells.

One aspect of retinoid signaling that is not yet clear is the metabolic route of all-*trans*, 9-*cis*, and 13-*cis* RA formation *in vivo*. It is generally accepted that all-*trans* retinol is the main precursor retinoid for the formation of RAs *in vivo* (39). Note in addition that, while it is generally believed that all-*trans* and 13-*cis* RA are naturally occurring retinoid forms (17, 38), the occurrence of 9-*cis* RA in tissues and cells is still disputed (8, 40–43). However, the existence of 9-*cis* and 13-*cis* retinol has been documented (19, 39). Several enzymes involved in the first oxidation step of the RA biosynthetic pathway have been shown to catalyze the oxidation of all-*trans*, 9-*cis*, and 13-*cis* retinol to the respective retinals (9, 10, 44). In the second step of RA synthesis, retinal is oxidized by at least three types of NAD⁺-dependent RALDHs differing in tissue expression and catalytic efficiencies for retinal isomers (9). Enzymatic assays have clearly demonstrated that the retinoids

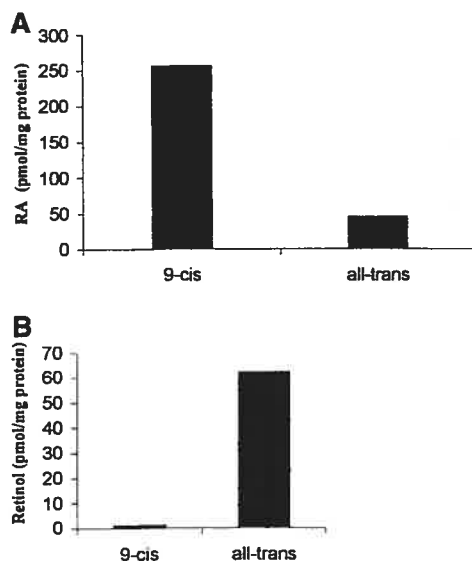


Fig. 10. Biosynthesis of RA and retinol from retinal precursors in JTC12 cells. JTC12 cells were grown in medium supplemented with 10 μ M all-*trans* or 9-*cis* retinal for 3 h. RA (A) or retinol (B) metabolites were measured by HPLC. The results represent the mean value of triplicate experiments.

maintain their steric configuration during the oxidation process of retinol to RA in vitro using either pure or recombinant enzymes (19, 30, 39). However, the metabolism of retinoids within tissues and cells is complex. Retinol taken up by the cells undergoes various metabolic transformations that include esterification to retinyl esters, activation to RA, and conjugation to glucuronic acid (9, 10, 45). Since JTC12 cells constitutively express high levels of an RALDH activity that catalyzes oxidation of all three retinal isomers into the corresponding RA isomers in vitro, we wanted to characterize the metabolites formed from each isoform of retinal and to assess whether isomerization can occur in live JTC12 cells.

HPLC analysis of cell extracts incubated with retinal isomers showed a dose-dependent production of RA produced in JTC12 cells (Fig. 8). Although retinal can form Schiff's bases with groups of proteins and amino acids (46), no cytotoxicity was observed at the concentrations used. In addition to oxidation to RA, all-*trans* retinal was also reduced to retinol (Fig. 9, peak 4) and subsequently esterified (data not included), suggesting the presence of retinol reductase and esterase in JTC12 cells. Since the first metabolic conversion of retinol to RA is a reversible reaction, the reductase may well represent a retinol dehydrogenase (10). Several investigators have reported that reduction to retinol and subsequent esterification to retinyl esters are the main metabolic products of administered retinal isomers in cells and tissues (39, 47). However, no retinol was detected after a 3 h incubation period with 9-*cis* retinal, while high levels of 9-*cis* RA were produced compared with all-*trans* RA (Fig. 10A), consistent with the substrate selectivity observed with recombinant RALDH1 in vitro (Fig. 7, Table 1). It is interesting that neither all-*trans* nor 9-*cis* retinal was detectable in the cells

(Fig. 9D, E), indicating rapid exhaustion of the substrate by oxidative and reductive enzymes.

In vivo, retinal is formed either from the oxidation of retinol or cleavage of β -carotene. However, the bulk of retinal generated from β -carotene is converted to retinol and then to retinyl esters, which are stored in peripheral target cells, or in the case of intestinal uptake, are transported by chylomicrons to the liver and subsequently stored in stellate cells (48). The rates of cleavage of 9-*cis* and 13-*cis* β -carotene are slower than that of the all-*trans* isomer (49). This may affect the rates of conversion of retinal isomers, formed from carotenoid precursors, to either retinol or RA. In addition, the expression levels and the substrate specificities of RALDHs and reductases may influence the metabolism of retinal isomers. Our experiments on retinal metabolism by JTC12 cells support the notion that the synthesis of either RA or retinol from retinal depends on the relative activities and specificities of RALDHs and retinal reductases for retinal substrates. Since retinal does not exist in free form in the cells, it is likely that retinal taken up by the cells is metabolized rapidly either to RA or retinol.

A recent study demonstrated that all-*trans* RA is a major metabolite of 13-*cis* retinal in pregnant rats supplemented with 13-*cis* retinal (47). We also observed production of all-*trans* metabolites in JTC12 cells incubated with 13-*cis* retinal, but this isomerization could be attributed to the significant conversion of 13-*cis* retinal to all-*trans* retinal in culture media (Fig. 9F). To examine whether 13-*cis* retinal maintains its steric configuration during metabolic conversion in the cells requires methods to stabilize it during incubation. Nevertheless, this problem was not encountered with all-*trans* or 9-*cis* retinal, which were converted to their respective metabolites without detectable isomerization by live JTC12 cells (Fig. 9). Several studies have shown that isomerization of the *trans* and *cis* isomers of externally provided RAs varies between 2% and 15% of total RA in tissues, cells, and microsomal extracts (11–15). Note that the detection limit of RAs in our HPLC systems is 1 pmol, which represents about 7.5% of the all-*trans* RA and 1.5% of the 9-*cis* RA produced in an assay of JTC12 cell extracts after in vivo incubation (Fig. 10A). Thus, if conversion of 9-*cis* to all-*trans* RA takes place in JTC12 cells, it occurs with very low efficiency. These observations are consistent with the findings of Sass et al. (47) and Kraft et al. (50), who reported that all-*trans* and 9-*cis* RA are the predominant in vivo metabolites of administered all-*trans* and 9-*cis* retinal, respectively. Furthermore, Liu et al. (51) demonstrated that parathyroid cells do not convert all-*trans* RA to 9-*cis* RA, but synthesize 9-*cis* RA from all-*trans* retinol. Taken together, these observations suggest that RA isomers are generated in target cells from different precursor retinoids rather than by isomeric exchange. Future studies directed toward the generation and use of selective retinal isomer-oxidizing enzymes (38) in in vitro transfection protocols as well as in an in vivo-expressing transgenic mouse system should provide greater insights into the formation and metabolic conversion of RAs. ■

This work was supported by a grant from the Canadian Institutes of Health Research (MOP-36485) to P.V.B. and S.M. The authors thank Sharmeen Nusrat for excellent technical assistance and Ovid M. Da Silva for editing our manuscript.

REFERENCES

- Strickland, S., and M. J. Sawey. 1980. Studies on the effect of retinoids on the differentiation of teratocarcinoma stem cells in vitro and in vivo. *Dev. Biol.* **78**: 76–85.
- Gudas, L. J., M. B. Sporn, and A. B. Roberts. 1994. Cellular biology and chemistry of the retinoids. In *The Retinoids: Biology, Chemistry, and Medicine*. M. B. Sporn, A. B. Roberts, and D. S. Goodman, editors. Raven Press Ltd, New York. 443–520.
- Hofmann, C., and G. Eichele. 1994. Retinoids in development. In *The Retinoids: Biology, Chemistry, and Medicine*. M. B. Sporn, A. B. Roberts, and D. S. Goodman, Editors. Raven Press Ltd, New York. 319–350.
- Saari, J. C. 1994. Retinoids in photosensitive systems. In *The Retinoids: Biology, Chemistry, and Medicine*. M. B. Sporn, A. B. Roberts, and D. S. Goodman, editors. Raven Press Ltd, New York. 351–386.
- Armstrong, R. B., K. O. Ashenfelder, C. Eckhoff, A. A. Levin, and S. S. Shapiro. 1994. General and reproductive toxicology of retinoids. In *The Retinoids: Biology, Chemistry, and Medicine*. M. B. Sporn, A. B. Roberts, and D. S. Goodman, editors. Raven Press Ltd, New York. 545–572.
- Ross, A. C., and U. Hammerling. 1994. Retinoids and the immune system. In *The Retinoids: Biology, Chemistry, and Medicine*. M. B. Sporn, A. B. Roberts, and D. S. Goodman, editors. Raven Press Ltd, New York. 521–544.
- Chambon, P. 1995. A decade of molecular biology of retinoic acid receptors. *FASEB J.* **10**: 940–954.
- Mangelsdorf, D. J., K. Umeson, and R. M. Evans. 1994. The retinoid receptors. In *The Retinoids: Biology, Chemistry, and Medicine*. M. B. Sporn, A. B. Roberts, and D. S. Goodman, editors. Raven Press Ltd, New York. 319–349.
- Duester, G. 2000. Families of retinoid dehydrogenases regulating vitamin A function: production of visual pigment and retinoic acid. *Eur. J. Biochem.* **267**: 4315–4324.
- Napoli, J. L. 2000. Retinoic acid: its biosynthesis and metabolism. *Prog. Nucleic Acid Res.* **63**: 139–188.
- Sundaresan, P. R., and P. V. Bhat. 1982. Ion-pair high-pressure liquid chromatography of cis-trans isomers of retinoic acid in tissues of vitamin A sufficient rats. *J. Lipid Res.* **23**: 448–455.
- Cullum, M. E., and M. H. Zile. 1985. Metabolism of all-trans retinoic acid and all-trans retinyl acetate: demonstration of common physiological metabolites in rat small intestinal mucosa and circulation. *J. Biol. Chem.* **260**: 10590–10596.
- Bhat, P. V., and A. M. Jetten. 1987. Metabolism of all-trans retinol and all-trans retinoic acid in rabbit tracheal epithelial cells in culture. *Biochim. Biophys. Acta.* **922**: 18–27.
- Kojima, R., T. Fujimori, N. Kiyota, Y. Toriya, T. Fukuda, T. Ohashi, T. Sato, Y. Yoshizawa, K. I. Takeyama, H. Mano, S. Masushige, and S. Kato. 1994. In vivo isomerization of retinoic acids: rapid isomer exchange and gene expression. *J. Biol. Chem.* **269**: 32700–32707.
- Urbach, J., and R. R. Rando. 1994. Isomerization of all-trans retinoic acid to 9-cis retinoic acid. *Biochem. J.* **299**: 459–465.
- Disdier, B., M. N. Marchetti, H. Bun, M. Placidi, and A. Durand. 2000. Kinetics of plasma and tissue distribution of 9-cis retinoic acid in rats. *Skin Pharmacol. Appl. Skin Physiol.* **13**: 9–16.
- Blaner, W. S. 2001. Cellular metabolism and actions of 13-cis retinoic acid. *J. Am. Acad. Dermatol.* **45**: S129–S135.
- Labrecque, J., P. V. Bhat, and A. Lacroix. 1993. Purification and partial characterization of a rat kidney aldehyde dehydrogenase that oxidizes retinal to retinoic acid. *Biochem. Cell Biol.* **71**: 85–89.
- Labrecque, J., F. Dumas, A. Lacroix, and P. V. Bhat. 1995. A novel isozyme of aldehyde dehydrogenase specifically involved in the biosynthesis of 9-cis and all-trans retinoic acid. *Biochem. J.* **305**: 681–684.
- Bhat, P. V., J. Labrecque, J.-M. Boutin, A. Lacroix, and A. Yoshida. 1995. Cloning of a cDNA encoding rat aldehyde dehydrogenase with high activity for retinal oxidation. *Gene.* **166**: 303–306.
- Bhat, P. V., M. Marcinkiewicz, Y. Li, and S. Mader. 1998. Changing patterns of renal retinal dehydrogenase expression parallel nephron development in the rat. *J. Histochem. Cytochem.* **46**: 1025–1032.
- Bhat, P. V. 1998. Retinal dehydrogenase gene expression in stomach and small intestine of rats during postnatal development and in vitamin A deficiency. *FEBS Lett.* **426**: 260–262.
- Fruta-Ruchon, A., M. Marcinkiewicz, and P. V. Bhat. 2000. Localization of retinal dehydrogenase type 1 in the stomach and intestine. *Cell Tissue Res.* **302**: 397–400.
- Ambroziak, W., I. Gonzalo, and R. Pietruszko. 1999. Metabolism of retinaldehyde and other aldehydes in soluble extracts of human liver and kidney. *J. Biol. Chem.* **274**: 33366–33373.
- Haselbeck, R. J., H. Ines, and G. Duester. 1999. Distinct functions for Aldh1 and Aldh2 in the control of ligand production for embryonic retinoid signaling pathways. *Dev. Genet.* **25**: 353–364.
- Bhat, P. V., H. T. Co, and A. Lacroix. 1983. Effect of 2-alkanols on the separation of geometric isomers of retinol in non-aqueous high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* **260**: 129–134.
- Bhat, P. V., and P. R. Sundaresan. 1988. High-performance liquid chromatography of vitamin A compounds. *CRC Critical Rev. Anal. Chem.* **20**: 197–219.
- Kathmann, E. C., S. Naylor, and J. J. Lipsky. 2000. Rat liver constitutive and phenobarbital-induced cytosolic aldehyde dehydrogenases are highly homologous proteins that function as distinct isozymes. *Biochemistry.* **39**: 11170–11176.
- Strausberg, R. 2000. Homo sapiens aldehyde dehydrogenase 1 family, member A1 (ALDH1A1) mRNA. GenBank accession no. gi: 4502030.
- Gagnon, I., G. Duester, and P. V. Bhat. 2002. Kinetic analysis of mouse retinal dehydrogenase type-2 (RALDH2) for retinal substrates. *Biochim. Biophys. Acta.* **1506**: 156–162.
- Bhat, P. V., L. Poissant, and A. Lacroix. 1998. Properties of retinal-oxidizing enzyme activity in rat kidney. *Biochim. Biophys. Acta.* **967**: 211–217.
- Bhat, P. V., L. M. De Luca, S. Adamo, I. Akalovsky, C. S. Silverman-Jones, and G. L. Peck. 1979. Retinoid metabolism in spontaneously transformed mouse fibroblasts (Balb/c 3T12-3 cells): enzymatic conversion of retinol to anhydroretinol. *J. Lipid Res.* **20**: 357–362.
- Bhat, P. V., L. M. De Luca, and M. L. Wind. 1980. Reverse phase high-pressure liquid chromatographic separation of retinoids, including retinylphosphate and mannosylretinylphosphate. *Anal. Biochem.* **102**: 243–248.
- Bhat, P. V., and A. Lacroix. 1986. Separation of geometric isomers of retinol and retinoic acid in non-aqueous high-performance liquid chromatography. In *Methods in Enzymology*. F. Chytil, and D. B. McCormick, editors. Academic Press, Orlando, FL. 75–85.
- Griun, F., Y. Hirose, S. Kawachi, T. Ogura, and K. Umeson. 2000. Aldehyde dehydrogenase 6, a cytosolic retinaldehyde dehydrogenase prominently expressed in sensory neuroepithelia during development. *J. Biol. Chem.* **275**: 41210–41218.
- Bhat, P. V., and H. Samaha. 1999. Kinetic properties of the human liver cytosolic aldehyde dehydrogenase for retinal isomers. *Biochem. Pharmacol.* **57**: 195–197.
- Ito, Y. L., M. Zile, M. Ahrens, and H. F. De Luca. 1978. Liquid-gel partition chromatography of vitamin A compounds in biological samples: formation of retinoic acid from retinyl acetate. *J. Lipid Res.* **15**: 517–521.
- Montplaisir, V., N. Chow Lan, J. Guimond, C. Savineau, P. V. Bhat, and S. Mader. 2002. Recombinant class I aldehyde dehydrogenases specific for all-trans or 9-cis retinal. *J. Biol. Chem.* **277**: 17486–17492.
- Paik, J., S. Vogel, R. Piantadosi, A. Sykes, W. S. Blaner, and K. Swishel. 2000. 9-cis-retinoids: biosynthesis of 9-cis retinoic acid. *Biochemistry.* **39**: 8073–8084.
- Werner, W. A., and H. F. De Luca. 2001. Metabolism of a physiological amount of all-trans-retinol in vitamin A-deficient rats. *Arch. Biochem. Biophys.* **393**: 262–270.
- Ulven, S. M., T. E. Gundersen, A. K. Sakhi, J. V. Glover, and R. Blomhoff. 2001. Quantitative axial profiles of retinoic acid in the embryonic mouse spinal cord. *Dev. Dyn.* **222**: 341–353.
- Ulven, S. M., T. E. Gundersen, M. S. Weedon, V. O. Landaas, A. K. Sakhi, S. H. Fromm, B. A. Geronimo, J. O. Moskaug, and R. Blomhoff. 2000. Identification of endogenous retinoids, enzymes, binding proteins, and receptors during early postimplantation development in mouse: important role of retinal dehydrogenase type 2 in synthesis of all-trans-retinoic acid. *Dev. Biol.* **220**: 379–391.

43. Horton, C., and M. Maden. 1995. Endogenous distribution of retinoids during normal development and teratogenesis in mouse embryo. *Dev. Dyn.* **202**: 312–323.
44. Mertz, J. R., E. Shang, R. Piantedosi, S. Wei., D. J. Wolgemuth, and W. S. Blaner. 1997. Identification and characterization of a stereospecific human enzyme that catalyzes 9-*cis* retinol oxidation. *J. Biol. Chem.* **272**: 33125–33131.
45. Blaner, W. S., and J. A. Olson. 1994. Retinoid and retinoic acid metabolism. In *The Retinoids: Biology, Chemistry, and Medicine*. M. B. Sporn, A. B. Roberts, and D. S. Goodman, editors. Raven Press Ltd, New York. 229–255.
46. Nathans, J. 1990. Determinants of visual pigment absorbance: identification of the retinylidene Schiff's base counterion in bovine rhodopsin. *Biochemistry*. **29**: 9746–9752.
47. Sass, J. O., G. Tzimas, M. A. E. Mohamed, and H. Nau. 1999. Metabolism of retinaldehyde isomers in pregnant rats: 13-*cis* and all-*trans*-retinaldehyde, but not 9-*cis* retinaldehyde, yield very similar patterns of retinoid metabolites. *Drug Metab. Dispos.* **27**: 317–321.
48. Olson, J. A. 1964. The biosynthesis and metabolism of carotenoids and retinol (vitamin A). *J. Lipid Res.* **5**: 281–299.
49. Nagao, A., and J. A. Olson. 1994. Enzymatic formation of 9-*cis*, 13-*cis*, and all-*trans* retinals from isomers of β -carotene. *FASEB J.* **8**: 968–973.
50. Kraft, J. C., D. Kimelman, and M. R. Juchau. 1995. *Xenopus laevis*: a model system for the study of embryonic retinoid metabolism. I. Embryonic metabolism of 9-*cis*- and all-*trans* retinals and retinols to their corresponding acid forms. *Drug Metab. Dispos.* **23**: 72–82.
51. Liu, W., P. Hellman, Q. Li, W.-R. Yu, C. Juhlin, H. Nordlinder, O. Rollman, G. Akerstrom, H. Törmä, and H. Melhus. 1996. Biosynthesis and function of all-*trans*- and 9-*cis*-retinoic acid in parathyroid cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **229**: 922–929.

MÉTABOLISME DES RÉTINOÏDES ET CANCER**RETINOID METABOLISM AND CANCER**

Maxime Parisotto, Hélène Brodeur , Pangala V. Bhat et Sylvie Mader

M. Parisotto et Sylvie Mader : Département de Biochemie et Institut de Recherche en Immunology et Cancérologie, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada. [REDACTED]

H. Brodeur et P. V. Bhat : Laboratoire de Nutrition et Cancer, Centre Hospitalier de l'Université de Montréal-Hotel Dieu, et Département de Médecine, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada. [REDACTED]

Accepté dans

Médecine/Sciences

Résumé

Les rétinoïdes jouent des rôles importants dans la différenciation cellulaire et l'apoptose, notamment dans les tissus épithéliaux. L'emploi d'acide rétinoïque (AR) dans le traitement de la leucémie promyélocytique aiguë (APL) a fourni la première démonstration de succès d'une thérapie anti-cancéreuse par un rétinoïde. Depuis, des traitements à base de rétinoïdes se sont révélés être d'une efficacité variable selon le type de cancer. Les voies métaboliques de synthèse et d'inactivation de l'AR sont affectées lors de la tumorigénèse et du traitement par les rétinoïdes. Une meilleure compréhension de la modulation de l'expression ou de l'activité de ces enzymes pourrait permettre d'optimiser l'utilisation des rétinoïdes dans le traitement de différents types de cancers.

Retinoids play important roles in cell differentiation and apoptosis, notably in epithelial tissues. Their utility in cancer therapy has been demonstrated in specific cancer types. Use of retinoic acid (RA) in treatment of acute promyelocytic leukemia was the first successful example of retinoid-based differentiation therapy. RA has since been evaluated for treatment of other cancers, revealing variable effectiveness. The observation that expression of enzymes involved in RA biosynthesis is suppressed during tumorigenesis suggests that intra-tumor depletion in RA levels may contribute to tumor development and argues for the use of retinoids in cancer treatment. However, the induction of RA-inactivating enzymes is one of the mechanisms that may limit the efficacy of retinoid therapy and contribute to acquired resistance to RA treatment, suggesting that retinoic acid metabolism blocking agents may be effective agents in differentiation therapy.

Rôle de l'acide rétinoïque dans la différenciation cellulaire et le cancer.

L'acide rétinoïque (AR), qui est synthétisé dans les tissus par deux étapes successives d'oxydation à partir du rétinol (vitamine A) provenant de l'alimentation, est la principale forme active de rétinoïde avec le rétinol 11-*cis*, qui participe au cycle visuel. Deux isomères de l'AR, les formes tout-*trans* et 9-*cis* (**Fig. 1**), sont des ligands de deux familles distinctes de récepteurs nucléaires, les RAR, qui interagissent avec les deux formes d'AR, et les RXR, qui s'associent spécifiquement à l'AR 9-*cis* (**Fig. 1**). Il est à noter cependant que l'existence de l'AR 9-*cis* *in vivo* reste controversée [1]. Un autre isomère naturel, l'AR 13-*cis*, ne lie pas ces récepteurs directement mais après isomérisation en AR tout-*trans* [2]. Les récepteurs de l'AR agissent comme facteurs de transcription, s'associant sous forme d'homodimères de RXR ou d'hétérodimères RAR-RXR à des séquences spécifiques d'ADN. Ces séquences sont composées de motifs répétés séparés par 1, 2, ou 5 paires de bases (**Fig. 1**). La complexité combinatoire des hétérodimères provenant de l'existence de plusieurs formes de RAR et de RXR (trois gènes α , β et γ , et plusieurs isoformes pour chaque gène) assure une régulation transcriptionnelle complexe des gènes cibles par l'AR (**Fig. 1** et [3, 4, 1]). De plus, les RXR peuvent également former des hétérodimères avec d'autres récepteurs nucléaires, dont certains (PPARs, FXR, LXR, Nurr1) sont permissifs pour une réponse transcriptionnelle à l'AR 9-*cis* [5]. La réponse d'un tissu à l'AR est gouvernée en partie par les profils d'expression des différents types de récepteurs [3, 4], mais aussi par ceux des enzymes impliquées dans le métabolisme de l'AR.

Le rôle important des rétinoïdes dans la différenciation cellulaire et le cancer a été démontré par les effets d'une carence ou d'un excès de rétinoïdes dans la diète, ainsi que par des altérations expérimentales ou pathologiques de l'expression des récepteurs. La déficience en vitamine A comme la délétion combinée de deux ou trois RAR provoquent de graves anomalies du développement chez la souris, avec des malformations craniofaciales, rénales et squelettiques, démontrant le rôle important de ces récepteurs dans la médiation de

l'action de l'AR en tant qu'agent de différenciation [3, 4]. Chez l'adulte, la déficience en vitamine A a été associée à une incidence accrue de cancers et à une plus grande sensibilité aux carcinogènes chimiques, tandis que des rétinoïdes naturels ou synthétiques inhibent la tumorigenèse induite par des carcinogènes au niveau de différents tissus [6-9]. Enfin, la diminution de l'expression du récepteur RAR- β 2 par l'expression de transgènes antisens a pour conséquence le développement de tumeurs pulmonaires chez la souris [10].

Divers rétinoïdes sont utilisés en clinique dans des approches de chimioprévention pour des patients porteurs de lésions pré-malignes telles la kératinose actinique, leukoplakie ou dysplasie cervicale, ou après le traitement de tumeurs primaires dans le cancer de la peau, des voies orales, du poumon ou du sein [7-9]. L'AR tout-*trans* et 13-*cis* sont actuellement utilisés pour le traitement de la leucémie promyélocytique aiguë (APL), du cancer de la prostate et du neuroblastome [8, 9, 2]. L'APL implique des translocations chromosomiques caractéristiques affectant RAR α (le plus fréquemment avec le gène PML, mais aussi avec PLZF, NPM, NuMa, STAT5b [11]). L'administration d'AR tout-*trans* permet la différenciation des promyélocytes contenant la fusion PML/RAR α et induit des rémissions complètes mais transitoires. L'AR 13-*cis* présente des propriétés pharmacocinétiques plus favorables que l'AR tout-*trans*, avec des concentrations plasmatiques plus élevées et une demi-vie plus longue, et pourrait donc être plus efficace dans le traitement de tumeurs, particulièrement lorsque administré de manière intermittente afin de minimiser l'induction d'enzymes d'inactivation [2]. Les "rexinoides" ou ligands sélectifs pour les RXR (par exemple le bexarotene, qui a démontré des résultats encourageants pour le traitement du cancer du poumon en combinaison avec la chimiothérapie) agiraient par contre en modulant les voies de signalisation d'autres récepteurs nucléaires par l'intermédiaire d'hétérodimères impliquant les RXR [4, 8, 9, 12].

L'utilisation de rétinoïdes en clinique est cependant limitée par le développement d'une résistance intrinsèque lors de la carcinogenèse dans les tumeurs solides et d'une résistance acquise lors du traitement de l'APL par l'AR tout-*trans*. Des mutations dominantes négatives surviennent dans la fusion

PML/RAR [6, 9]. Une inactivation épigénétique des RAR (RAR β en particulier) a également été mise en évidence dans de nombreuses tumeurs solides, et peut être abolie par traitement aux inhibiteurs de méthylation de l'ADN [9]. De plus, plusieurs mécanismes peuvent contribuer à une résistance aux rétinoïdes en limitant les concentrations d'AR intracellulaire, incluant un rôle possible mais controversé de la protéine de résistance aux drogues multiples, et l'induction de l'expression d'enzymes d'inactivation de l'AR [7-9]. La résistance à l'AR pourrait donc être combattue par l'utilisation d'inhibiteurs du métabolisme de l'AR ou de rétinoïdes synthétiques non soumis à ces processus d'inactivation.

Synthèse et dégradation de l'acide rétinoïque :

Le rétinol est le rétinoïde majoritaire dans le sang, provenant de la conversion du β -carotène et des rétinyl esters alimentaires dans l'intestin et/ou des rétinyl esters stockés dans le foie. L'AR est présent en beaucoup plus faibles concentrations dans le plasma, et est synthétisé dans les tissus possédant le système enzymatique approprié. L'oxydation du rétinol en AR est un processus enzymatique en deux étapes dont le rétinol est le métabolite intermédiaire, la première oxydation étant réversible et la deuxième irréversible. La synthèse de l'AR implique plusieurs déshydrogénases appartenant à 4 familles distinctes, soient les alcool déshydrogénases (ADH), les déshydrogénases/réductases à chaînes courtes (SDR), les aldéhyde déshydrogénases (ALDH), ainsi que les enzymes de la famille des cytochromes P450 (**Fig. 2**) [1, 13]. Certaines de ces enzymes montrent une sélectivité envers les isomères du rétinol et/ou rétinol (**Table 1**). L'importance des ADH et des ALDH dans la synthèse de l'AR lors de l'embryogenèse et chez l'adulte est illustrée par leurs domaines d'expression et par les phénotypes résultant de l'inactivation génique chez la souris. ADH3 est exprimée de manière ubiquitaire lors de l'embryogenèse, assurant une conversion du rétinol en rétinol dans la plupart des tissus. RALDH2 est principalement responsable de la conversion histo-spécifique du rétinol en AR dans le mésoderme embryonnaire, la suppression ciblée de RALDH2 chez la souris provoquant une

mort embryonnaire précoce [13]. Chez l'adulte, les ADH de classe I et IV ainsi que RALDH1/4 sont exprimées dans les épithélia qui dépendent de l'AR pour leur différenciation normale [13]. Le rôle exact dans la biosynthèse de l'AR des membres de la famille des SDR et des P450, ainsi que d'autres enzymes telles l'aldéhyde oxydase et la xanthine oxydase, nécessite par contre plus de données sur leurs domaines d'expression et leur spécificité de substrat *in vivo*. Certaines des enzymes SDR ont en effet une activité supérieure avec d'autres substrats, tels les stéroïdes ou prostanoïdes, ou participent à la synthèse de 11-*cis* rétinol pour le cycle visuel [1, 13].

Les AR tout-*trans*, 9-*cis* et 13-*cis* sont convertis en dérivés inactifs, la première étape étant une conversion en 4-hydroxy- et 18-hydroxy-AR (Fig. 2). La conversion en 4-hydroxy-AR dépend de l'action d'enzymes P450, dont les plus spécifiques et efficaces sont les CYP26A1/B1/C1, qui ont comme substrat l'AR tout-*trans*, CYP26C1 métabolisant également l'AR 9-*cis* [7, 2] (Table 1). L'ablation génétique de CYP26A1 et de CYP26B1 révèle des anomalies de développement ressemblant fortement aux effets tératogènes de l'AR tout-*trans* [14, 15], Chez les mutants CYP26A1 nuls, la suppression hétérozygote de RALDH2 ou l'ablation de RAR γ corrige le phénotype d'excès d'AR et prolonge la survie embryonnaire [16, 17], suggérant que le rôle clé de CYP26A1 est de maintenir des régions de l'embryon dans un état dépourvu d'AR. L'expression de CYP26A1 est inductible par l'AR dans le foie et plusieurs tissus extra-hépatiques, résultant en une boucle de rétroaction négative sur les niveaux d'AR tout-*trans* [7]. D'autres enzymes à cytochrome P450 pourraient inactiver les formes tout-*trans*, 9-*cis* ou 13-*cis*, mais ont des valeurs de Km beaucoup plus élevées [1, 2].

Deux familles de protéines cytoplasmiques, les *cellular retinol-binding proteins* (CRBP I, II et III) et les *RA-binding proteins* (CRABP I et II) pourraient aussi participer au métabolisme de la vitamine A [3, 4, 1, 18, 2]. CRBPI n'est pas nécessaire au développement normal et à la survie pour autant que la diète ne soit pas carencée en vitamine A, mais joue un rôle important dans l'accumulation des rétinyl esters dans le foie [19]. CRABPI a été impliquée dans le catabolisme de l'AR et CRABPII dans la présentation de l'AR aux RAR, cependant l'inactivation

génique de CRABPI et II chez la souris ne semble pas affecter la signalisation par l'AR de façon marquée [20].

Séquestration et inactivation de l'AR lors du traitement anticancéreux :

L'AR induit l'expression de CRABPII dans les cellules hématopoïétiques normales et leucémiques; il a été proposé que CRABPII pourrait séquestrer l'AR tout-*trans* et ainsi contribuer à une résistance au traitement. Cependant, les données sur une corrélation entre l'expression accrue de CRABPII et la récurrence de l'APL sont contradictoires, et d'un autre côté un rôle de coactivateur des RARs a été proposé pour CRABPII [9, 2]. D'un autre côté, l'induction de l'expression de CYP26A1 par l'AR, susceptible de diminuer les concentrations d'AR dans les cellules leucémiques et/ou dans le sang, pourrait contribuer à limiter la sensibilité aux traitements par l'AR [6, 7, 9].

Une stratégie alternative à la thérapie par l'AR tout-*trans* exogène est d'augmenter le taux d'AR circulant et/ou dans les tumeurs en inhibant les enzymes responsables de son inactivation par des *retinoic acid metabolism blocking agents* (RAMBA) [6]. *In vivo*, le traitement avec le RAMBA le plus étudié, le liarozole fumarate (LIA), qui augmente le taux d'AR dans le plasma et dans les tissus, a généré des résultats prometteurs dans le traitement des cancers avancés du sein et de la prostate [7, 2]. Toutefois, le LIA inhibe plusieurs enzymes P450, incluant l'aromatase, responsable de la biosynthèse des oestrogènes, et la 25-hydroxyvitamine D-24-hydroxylase, responsable de l'inactivation de la 1,25-(OH)₂D₃, ce qui pourrait contribuer à ses propriétés anticancéreuses *in vivo*. De nouveaux RAMBA récemment développés, tels le R115866 [21] ou le R116010 [22] démontrent une plus grande efficacité et spécificité dans l'inhibition des CYP26. D'autre part, l'utilisation de rétinoïdes résistants au catabolisme, mais conservant une affinité élevée pour les récepteurs, pourrait aussi permettre d'augmenter l'efficacité du traitement anti-cancéreux.

Déficience de l'absorption du rétinol et de la biosynthèse d'AR lors de la tumorigenèse :

De plus en plus de travaux démontrent une altération de l'absorption des rétinoïdes et de la biosynthèse de l'AR au niveau de la tumeur elle-même. Il a été observé que la concentration en AR *tout-trans* est plus faible dans certains tissus cancéreux que dans les tissus normaux correspondants, comme par exemple dans le cas du cancer de la prostate [6]. Une diminution de l'absorption de rétinol et de l'activité rétinol oxydase a été observée dans un modèle de carcinome mammaire induit par la N-méthyl-N-nitroso-urée chez le rat, par rapport aux tissus sains [23]. Une autre étude a observé une diminution de la production de rétinyl esters et de la synthèse d'AR dans deux lignées de cancer du sein humaines [24]. Une inactivation épigénétique de CRBPI est observée dans plusieurs cancers, dont le cancer du sein, et la réexpression de cette protéine dans des cellules mammaires immortalisées supprime la tumorigenèse *in vivo* [25]. Une capacité fortement réduite de synthétiser l'AR a été observée dans plusieurs lignées humaines de carcinome mammaire même en présence de liarozole, démontrant que l'inactivation de l'AR par les enzymes P450 n'est pas responsable de la faible synthèse d'AR [26]. Les cellules humaines MCF-7 de cancer du sein transfectées avec l'ADNc de cRDH (RDH5) retrouvent la capacité d'absorber rapidement et d'oxyder le rétinol 9-*cis* en rétinol 9-*cis*, mais pas en AR 9-*cis* [27]. En effet, les cellules MCF7 n'expriment pas la RALDH3 trouvée dans les cellules épithéliales mammaires normales [28].

D'autres déficiences dans les voies de biosynthèse de l'AR ont été observées dans divers types de cancer. L'expression de RALDH2 est fréquemment réduite dans les tumeurs de la prostate, correspondant à une durée de rémission plus courte; le traitement par un inhibiteur de la méthylation de l'ADN permet de restaurer l'expression de ce gène dans la lignée cellulaire DU145 [29]. Dans les tumeurs du poumon l'expression de RALDH1 est réduite d'un facteur 10 environ [30]. Dans les adénomes et carcinomes du colon, une réduction de l'expression de deux gènes impliqués dans la biosynthèse de l'AR,

RDH5 et RDHL (DHRS9) a été observée par rapport aux tissus normaux. La conversion du rétinol en AR était aussi plus faible dans 7 lignées de carcinome du colon en comparaison avec des cellules normales [31]. Enfin, l'expression de la RoDH-4 est nettement réduite dans les tumeurs de l'endomètre [32] et le gène humain retSDR1 est fréquemment perdu dans des cellules NB portant une amplification de MYCN [33]. Dans l'ensemble, ces observations suggèrent donc qu'une altération de l'expression d'enzymes essentielles à la biosynthèse d'AR *in situ* peut être associée au développement de plusieurs types de cancer. Les mécanismes de ces altérations restent à explorer, et pourraient impliquer une inactivation épigénétique des gènes correspondants ou de facteurs transcriptionnels contrôlant leur expression, dont potentiellement dans certains cas les RAR eux-mêmes.

Conclusions : L'inactivation métabolique inductible des rétinoïdes pourrait limiter l'utilisation thérapeutique de composés substrats de cette voie métabolique, conduisant au développement d'agents bloqueurs du métabolisme de l'AR. Cependant, la réduction de la production d'AR observée dans certains types de cancers pourrait limiter l'efficacité de ces composés et indiquer l'importance de tester ces inhibiteurs en combinaison avec l'administration d'AR plutôt qu'en thérapie simple, ou de développer des rétinoïdes résistants à l'inactivation métabolique. Finalement, quelle que soit l'approche retenue, la toxicité associée au traitement par les rétinoïdes reste un problème à résoudre.

Références

1. Napoli JL. Interactions of retinoid binding proteins and enzymes in retinoid metabolism. *Biochim Biophys Acta* 1999; 1440: 139-62.
2. Armstrong JL, Redfern CP and Veal GJ. 13-cis retinoic acid and isomerisation in paediatric oncology--is changing shape the key to success? *Biochem Pharmacol* 2005; 69: 1299-306.
3. Giguere V. Retinoic acid receptors and cellular retinoid binding proteins: complex interplay in retinoid signaling. *Endocr Rev* 1994; 15: 61-79.
4. Chambon P. A decade of molecular biology of retinoic acid receptors. *Faseb J* 1996; 10: 940-54.

5. Shulman AI, Larson C, Mangelsdorf DJ et al. Structural determinants of allosteric ligand activation in RXR heterodimers. *Cell* 2004; 116: 417-29.
6. Miller WH, Jr. The emerging role of retinoids and retinoic acid metabolism blocking agents in the treatment of cancer. *Cancer* 1998; 83: 1471-82.
7. Petkovich PM. Retinoic acid metabolism. *J Am Acad Dermatol* 2001; 45: S136-42.
8. Sun SY and Lotan R. Retinoids and their receptors in cancer development and chemoprevention. *Crit Rev Oncol Hematol* 2002; 41: 41-55.
9. Freemantle SJ, Spinella MJ and Dmitrovsky E. Retinoids in cancer therapy and chemoprevention: promise meets resistance. *Oncogene* 2003; 22: 7305-15.
10. Berard J, Laboune F, Mukuna M et al. Lung tumors in mice expressing an antisense RARbeta2 transgene. *Faseb J* 1996; 10: 1091-7.
11. Pitha-Rowe I, Petty WJ, Kitareewan S et al. Retinoid target genes in acute promyelocytic leukemia. *Leukemia* 2003; 17: 1723-30.
12. Rigas JR and Dragnev KH. Emerging role of rexinoids in non-small cell lung cancer: focus on bexarotene. *Oncologist* 2005; 10: 22-33.
13. Duester G, Mic FA and Molotkov A. Cytosolic retinoid dehydrogenases govern ubiquitous metabolism of retinol to retinaldehyde followed by tissue-specific metabolism to retinoic acid. *Chem Biol Interact* 2003; 143-144: 201-10.
14. Abu-Abed S, Dolle P, Metzger D et al. The retinoic acid-metabolizing enzyme, CYP26A1, is essential for normal hindbrain patterning, vertebral identity, and development of posterior structures. *Genes Dev* 2001; 15: 226-40.
15. Yashiro K, Zhao X, Uehara M et al. Regulation of retinoic acid distribution is required for proximodistal patterning and outgrowth of the developing mouse limb. *Dev Cell* 2004; 6: 411-22.
16. Niederreither K, Abu-Abed S, Schuhbaur B et al. Genetic evidence that oxidative derivatives of retinoic acid are not involved in retinoid signaling during mouse development. *Nat Genet* 2002; 31: 84-8.
17. Abu-Abed S, Dolle P, Metzger D et al. Developing with lethal RA levels: genetic ablation of Rarg can restore the viability of mice lacking Cyp26a1. *Development* 2003; 130: 1449-59.
18. Vogel S, Mendelsohn CL, Mertz JR et al. Characterization of a new member of the fatty acid-binding protein family that binds all-trans-retinol. *J Biol Chem* 2001; 276: 1353-60.
19. Ghyselinck NB, Bavik C, Sapin V et al. Cellular retinol-binding protein I is essential for vitamin A homeostasis. *Embo J* 1999; 18: 4903-14.
20. Lampron C, Rochette-Egly C, Gorry P et al. Mice deficient in cellular retinoic acid binding protein II (CRABPII) or in both CRABPI and CRABPII are essentially normal. *Development* 1995; 121: 539-48.
21. Stoppie P, Borgers M, Borghgraef P et al. R115866 inhibits all-trans-retinoic acid metabolism and exerts retinoidal effects in rodents. *J Pharmacol Exp Ther* 2000; 293: 304-12.

22. Armstrong JL, Ruiz M, Boddy AV et al. Increasing the intracellular availability of all-trans retinoic acid in neuroblastoma cells. *Br J Cancer* 2005; 92: 696-704.
23. Bhat PV and Lacroix A. Metabolism of retinol and retinoic acid in N-methyl-N-nitrosourea-induced mammary carcinomas in rats. *Cancer Res* 1989; 49: 139-44.
24. Hayden LJ and Satre MA. Alterations in cellular retinol metabolism contribute to differential retinoid responsiveness in normal human mammary epithelial cells versus breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat* 2002; 72: 95-105.
25. Farias EF, Ong DE, Ghyselinck NB et al. Cellular retinol-binding protein I, a regulator of breast epithelial retinoic acid receptor activity, cell differentiation, and tumorigenicity. *J Natl Cancer Inst* 2005; 97: 21-9.
26. Mira YLR, Zheng WL, Kuppumbatti YS et al. Retinol conversion to retinoic acid is impaired in breast cancer cell lines relative to normal cells. *J Cell Physiol* 2000; 185: 302-9.
27. Paik J, Blaner WS and Swisshelm K. Cis-retinol dehydrogenase: 9-cis-retinol metabolism and its effect on proliferation of human MCF7 breast cancer cells. *Exp Cell Res* 2005; 303: 183-96.
28. Rexer BN, Zheng WL and Ong DE. Retinoic acid biosynthesis by normal human breast epithelium is via aldehyde dehydrogenase 6, absent in MCF-7 cells. *Cancer Res* 2001; 61: 7065-70.
29. Kim H, Lapointe J, Kaygusuz G et al. The retinoic acid synthesis gene ALDH1a2 is a candidate tumor suppressor in prostate cancer. *Cancer Res* 2005; 65: 8118-24.
30. Dragani TA, Falvella FS, Manenti G et al. Downexpression of aldehyde dehydrogenase 1 in murine lung tumors. *Mol Carcinog* 1996; 16: 123-5.
31. Jette C, Peterson PW, Sandoval IT et al. The tumor suppressor adenomatous polyposis coli and caudal related homeodomain protein regulate expression of retinol dehydrogenase L. *J Biol Chem* 2004; 279: 34397-405.
32. Cain JM, Zaino R, Shearer D et al. Expression of a retinol dehydrogenase (hRoDH-4), a member of the retinol/steroid dehydrogenase family implicated in retinoic acid biosynthesis, in normal and neoplastic endometria. *Am J Obstet Gynecol* 2002; 186: 675-83.
33. Cerignoli F, Guo X, Cardinali B et al. retSDR1, a short-chain retinol dehydrogenase/reductase, is retinoic acid-inducible and frequently deleted in human neuroblastoma cell lines. *Cancer Res* 2002; 62: 1196-204.

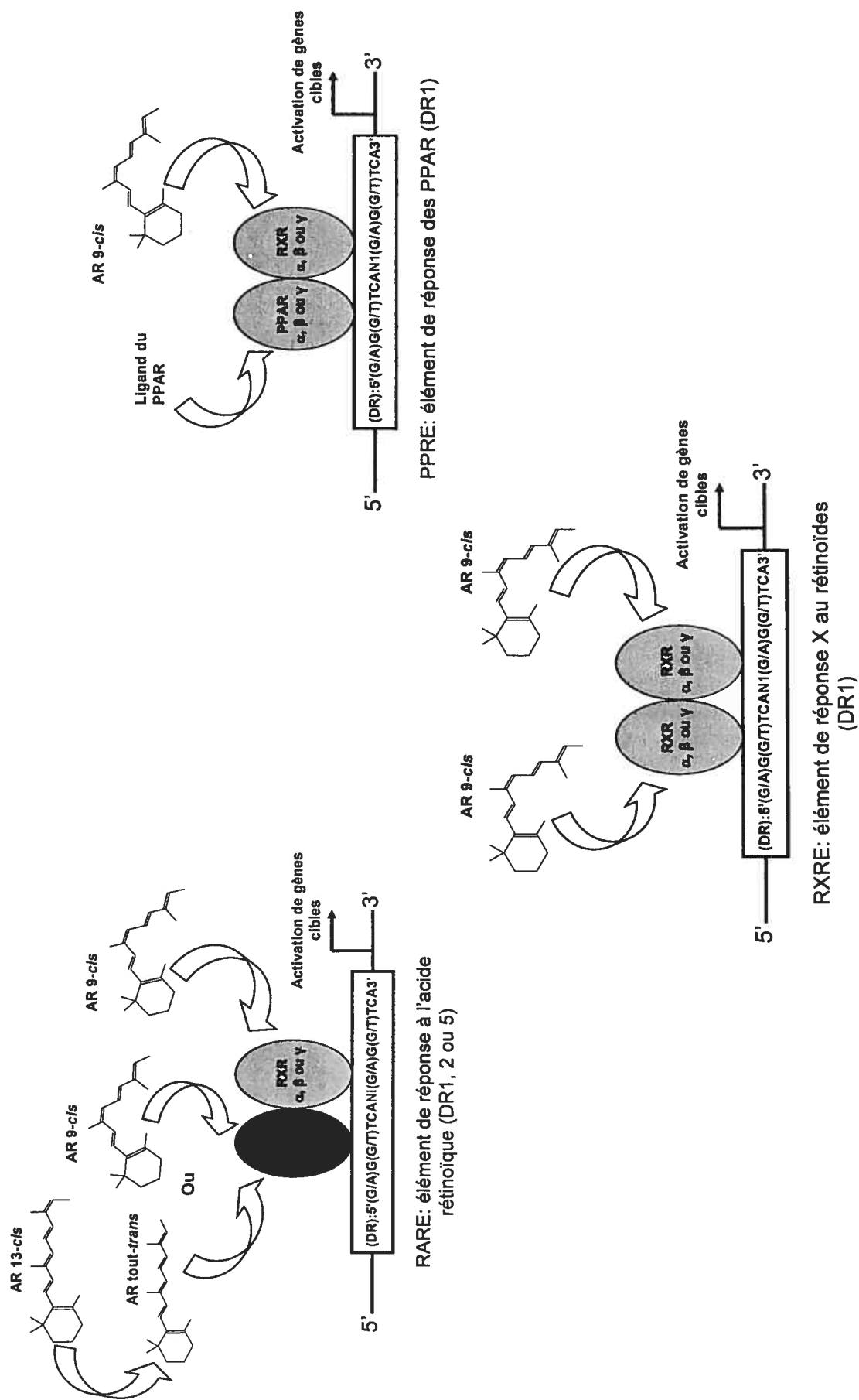


Fig. 1: Activation de récepteurs nucléaires par l'acide rétinoïque.

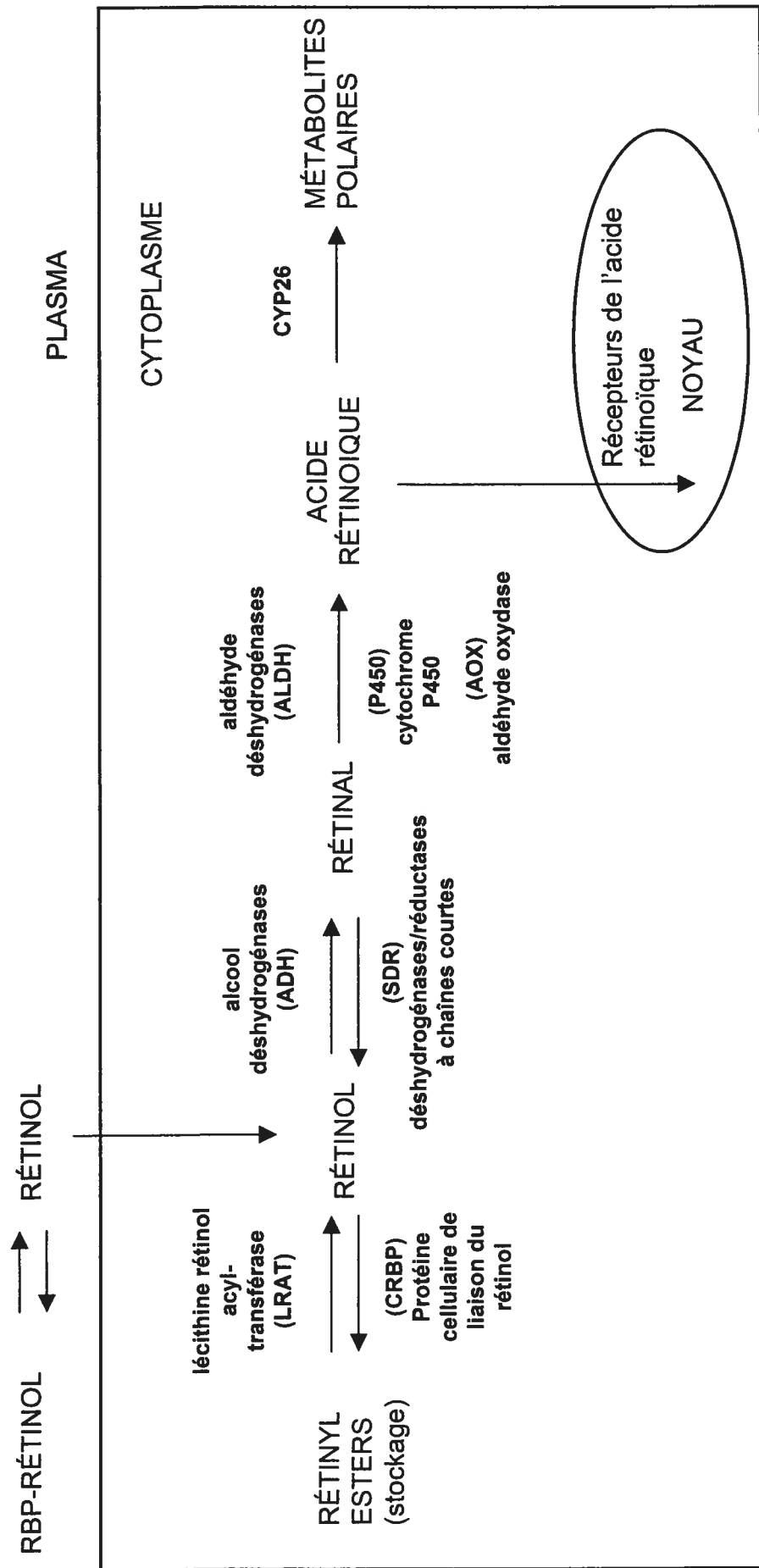


Fig. 2: Etapes enzymatiques impliquées dans la biosynthèse de l'AR à partir du rétinol.

Enzymes métaboliques	tout- <i>trans</i>	9- <i>cis</i>	13- <i>cis</i>	Référence Pubmed
Famille ADH				
ADH1	+ (Rol/Ral)	+ (Rol/Ral)	-	15096205, 10358022
ADH3	+ (Rol)	?	?	11959987, 12782305, 12027900, 8239669
ADH4	+ (Rol/Ral)	+ (Rol/Ral)	+ (Rol/Ral)	9600267, 15096205, 8239669
Famille RALDH				
RALDH1	+ (Ral)	+ (Ral)	+* (Ral)	8329181, 1527087, 8110799, 12754104
RALDH2	+ (Ral)	+ (Ral)	+ (Ral)	11983430
RALDH3	+ (Ral)	?	?	1158573, 11013254
RALDH4	-	+ (Ral)	+/- (Ral)	12519776, 1100779
Famille CYP26				
CYP26A1	+ (RA)	- (RA)	- (RA)	9716180, 9740237
CYP26B1	+ (RA)	- (RA)	- (RA)	14532297
CYP26C1	+ (RA)	+ (RA)	- (RA)	14532297
Protéines de liaison				
	tout- <i>trans</i>	9- <i>cis</i>	13- <i>cis</i>	Référence Pubmed
CRBPs				
CRBPI	+ (Rol)	- (Rol)	+ (Rol)	6537950, 3611082, 7781925
CRBPII	+ (Rol/Ral)	- (Rol)	+ (Rol)	1542003, 3611082, 7781925
CRBPIII	+ (Rol)	+ (Rol)	+ (Rol)	11022035
CRABPs				
CRABPI	+ (RA)	-	-	1653241, 8382035, 8380496, 7704533, 8408005, 7947970
CRABPII	+ (RA)	-	-	8408005, 8382035, 8380496, 7947970
Récepteurs				
	tout- <i>trans</i>	9- <i>cis</i>	13- <i>cis</i>	Référence Pubmed
RARs	+ (RA)	+ (RA)	-	8380496, 2825025
RXR _s	-	+ (RA)	-	8380496, 1309942

Table I: spécificité de substrat des enzymes du métabolisme de l'AR

* variations entre espèces



Article #1
Accord des coauteurs

Hélène Brodeur
PhD Sciences biomédicales

Characterization of the rat RALDH1 promoter : A functional CCAAT and octamer motif are critical for basal promoter activity.

Julie Guimond, Dominic Devost, Hélène Brodeur, Sylvie Mader, Pangala V. Bhat.

Publié dans :
Biochimica et Biophysica Acta 1579 (2002) 81-91.

À titre de coauteur de l'article identifié ci-dessus, je suis d'accord pour que **Hélène Brodeur** inclue cet article dans sa **thèse de doctorat** qui a pour titre **Étude du rôle des aldéhydes déshydrogénases de classe I dans la biosynthèse de l'acide rétinolique**.

 11 janvier 2006
Julie Guimond Date

Dominic Devost Date

Sylvie Mader Date

 16 / 01 / 06
Pangala V. Bhat Date

Article #1
Accord des coauteurs

Hélène Brodeur
PhD Sciences biomédicales

Characterization of the rat RALDH1 promoter : A functional CCAAT and octamer motif are critical for basal promoter activity.

Julie Guimond, Dominic Devost, Hélène Brodeur, Sylvie Mader, Pangala V. Bhat.

Publié dans :
Biochimica et Biophysica Acta 1579 (2002) 81-91.

À titre de coauteur de l'article identifié ci-dessus, je suis d'accord pour que **Hélène Brodeur** inclue cet article dans sa thèse de doctorat qui a pour titre **Étude du rôle des aldéhydes déshydrogénases de classe I dans la biosynthèse de l'acide rétinolique.**

Julie Guimond

Date

[Redacted Signature]

12/01/2006

Dominic Devost

Date

Sylvie Mader

Date

[Redacted Signature]

16/01/06

Pangala V. Bhat

Date

Article #1
Accord des coauteurs


Hélène Brodeur
PhD Sciences biomédicales

Characterization of the rat RALDH1 promoter : A functional CCAAT and octamer motif are critical for basal promoter activity.

Julie Guimond, Dominic Devost, Hélène Brodeur, Sylvie Mader, Pangala V. Bhat.

Publié dans :
Biochimica et Biophysica Acta **1579** (2002) 81-91.

À titre de coauteur de l'article identifié ci-dessus, je suis d'accord pour que **Hélène Brodeur** inclue cet article dans sa **thèse de doctorat** qui a pour titre **Étude du rôle des aldéhydes déshydrogénases de classe I dans la biosynthèse de l'acide rétinoïque**.

Julie Guimond	Date
Dominic Devost	Date
	21-01-02
Sylvie Mader	Date
Pangala V. Bhat	Date

Date: Thu, 12 Jan 2006 11:38:25 -0000

De: "Smith, Stephanie (ELS-OXF)" [REDACTED]

À: [REDACTED]

Objet: RE: Obtain Permission

We hereby grant you permission to reproduce the material detailed below in your thesis at no charge subject to the following conditions:

1. If any part of the material to be used (for example, figures) has appeared in our publication with credit or acknowledgement to another source, permission must also be sought from that source. If such permission is not obtained then that material may not be included in your publication/copies.

2. Suitable acknowledgment to the source must be made, either as a footnote or in a reference list at the end of your publication, as follows:

"Reprinted from Publication title, Vol number, Author(s), Title of article, Pages No., Copyright (Year), with permission from Elsevier".

3. Reproduction of this material is confined to the purpose for which permission is hereby given.

4. This permission is granted for non-exclusive world English rights only. For other languages please reapply separately for each one required. Permission excludes use in an electronic form. Should you have a specific electronic project in mind please reapply for permission.

5. This includes permission for the National Library of Canada to supply single copies, on demand, of the complete thesis. Should your thesis be published commercially, please reapply for permission.

Yours sincerely

Steph Smith
Global Rights Administrator

The Boulevard
Langford Lane
Kidlington
Oxford OX5 1GB

-----Original Message-----

From: [REDACTED]
Sent: 11 January 2006 14:14
To: permissions@elsevier.com
Subject: Obtain Permission

This Email was sent from the Elsevier Corporate Web Site and is related to Obtain Permission form:

Product: Customer Support
Component: Obtain Permission
Web server: http://www.elsevier.com
IP address: 10.10.24.149
Client: Mozilla/4.0 (compatible; MSIE 6.0; Windows NT 5.1; SV1; .NET

<https://www.courrier.umontreal.ca/horde/imp/message.php?actionID=148&mailbox=INBO...> 12/01/06

Article #2
Accord des coauteurs

Hélène Brodeur
PhD Sciences biomédicales

Cloning of monkey RALDH1 and characterization of retinoid metabolism in monkey kidney proximal tubule cells.

Hélène Brodeur, Isabelle Gagnon, Sylvie Mader, Pangala V. Bhat.

Publié dans :
Journal of lipids research 44 (2003) 303-313.

À titre de coauteur de l'article identifié ci-dessus, je suis d'accord pour que **Hélène Brodeur** inclue cet article dans sa thèse de doctorat qui a pour titre **Étude du rôle des aldéhydes déshydrogénases de classe I dans la biosynthèse de l'acide rétinoïque.**


Isabelle Gagnon

01/12/06

Date


Pangala V. Bhat

Date

21/01/06

16/01/06

Date

Article #2
Accord des coauteurs

Hélène Brodeur
PhD Sciences biomédicales

Cloning of monkey RALDH1 and characterization of retinoid metabolism in monkey kidney proximal tubule cells.

Hélène Brodeur, Isabelle Gagnon, Sylvie Mader, Pangala V. Bhat.

Publié dans :
Journal of lipids research 44 (2003) 303-313.

À titre de coauteur de l'article identifié ci-dessus, je suis d'accord pour que **Hélène Brodeur** inclue cet article dans sa **thèse de doctorat** qui a pour titre **Étude du rôle des aldéhydes déshydrogénases de classe I dans la biosynthèse de l'acide rétinolique.**

Isabelle Gagnon

Date



21-01-06

Sylvie Mader

Date

Pangala V. Bhat

Date

ARTICLE #2

ACCORD DE L'ÉDITEUR

Journal of Lipid Research

University of California,

San Diego

9500 Gilman Drive

La Jolla,

CA 92093-0601

Tel: 858-534-3055

Fax: (858)534-7390 fax

Éditeur en chef :

Dennis, Edward A., Editor-in-Chief

Cloning of monkey RALDH1 and characterization of retinoid metabolism in monkey kidney proximal tubule cells.

Hélène Brodeur, Isabelle Gagnon, Sylvie Mader, Pangala V. Bhat.

Journal of lipids research 44 (2003) 303-313.

L'étudiante **Hélène Brodeur** est autorisée à inclure l'article ci-dessus dans sa thèse de doctorat qui a pour titre **Étude du rôle des aldéhydes déshydrogénases de classe I dans la biosynthèse de l'acide rétinolique.**

JOHN CHILBERT

Éditeur

Signature

JAN 12 2006

Date

THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY
9650 Rockville Pike
Bethesda, Maryland 20814

Article #3
Accord des coauteurs

Hélène Brodeur
PhD Sciences biomédicales

Kinetic properties of chimeric class I aldehyde dehydrogenase for retinal isomers.

Hélène Brodeur, Samuel Chagnon, Maxime Parisotto, Sylvie Mader, Pangala V. Bhat.

Soumis à :
Biochemistry and cell biology.

À titre de coauteur de l'article identifié ci-dessus, je suis d'accord pour que **Hélène Brodeur** inclue cet article dans sa thèse de doctorat qui a pour titre **Étude du rôle des aldéhydes déshydrogénases de classe I dans la biosynthèse de l'acide rétinique**.


Samuel Chagnon

12-01-06
Date

Maxime Parisotto

Date

Sylvie Mader

Date


Pangala V. Bhat

25-1-06
Date

Artile #3
Accord des coauteurs

Hélène Brodeur
PhD Sciences biomédicales

Kinetic properties of chimeric class I aldehyde dehydrogenase for retinal isomers.

Hélène Brodeur, Samuel Chagnon, Maxime Parisotto, Sylvie Mader, Pangala V. Bhat.

Soumis à :
Biochemistry and cell biology.

À titre de coauteur de l'article identifié ci-dessus, je suis d'accord pour que **Hélène Brodeur** inclue cet article dans sa **thèse de doctorat** qui a pour titre **Étude du rôle des aldéhydes déshydrogénases de classe I dans la biosynthèse de l'acide rétinique**.

Samuel Chagnon

Date

Maxime Parisotto

Date

20/01/06

Date
20/01/06

Pangala V. Bhat

Date



Inbrodeur@hotmail.com

Printed: April 13, 2006 9:18:56 PM

From : [REDACTED]
Sent : April 11, 2006 7:51:25 PM
To : [REDACTED]
Subject : RE: demande d'autorisation

Nous vous accordons la permission d'utiliser l'information comme indiqué ci-dessous pour autant que la source soit dûment mentionnée.

Jason Charron

Business Manager

NRC Research Press

Tel: 613-993-9093

Fax: 613-952-7656

-----Original Message-----

From: Hélène Brodeur [mailto:[REDACTED]]
Sent: April 11, 2006 12:43 PM
To: CISTI, Research Press
Subject: demande d'autorisation

Bonjour,

Je suis en rédaction de ma thèse de doctorat sous forme d'article. Pour ce faire, j'ai besoin de l'autorisation des co-auteurs ainsi que de l'éditeur de la revue pour pouvoir inclure l'article dans ma thèse. Dernièrement, un de mes articles a été accepté pour publication dans votre journal biochimie et biologie cellulaire. Je vous envoie, en document attaché, une feuille d'autorisation de l'éditeur.

L'article est: kinetic properties of chimeric class I aldehyde dehydrogenases for retinal isomers.
par: Hélène Brodeur, Samuel Chagnon, Maxime Parisotto, Sylvie Mader et Pangala V. Bhat.

Bonne journée et merci
Hélène Brodeur

Article #4
Accord des coauteurs

Hélène Brodeur
PhD Sciences biomédicales

Isomer-specific retinoic acid biosynthesis in HeLa cells expressing recombinant class I aldehyde dehydrogenase

Hélène Brodeur, Samuel Chagnon, Maxime Parisotto, Sylvie Mader, Pangala V. Bhat.

En préparation

À titre de coauteur de l'article identifié ci-dessus, je suis d'accord pour que **Hélène Brodeur** inclue cet article dans sa thèse de doctorat qui a pour titre **Étude du rôle des aldéhydes déshydrogénases de classe I dans la biosynthèse de l'acide rétinoïque.**


Samuel Chagnon

12-01-06
Date

Maxime Parisotto

Date

Sylvie Mader

Date


Pangala V. Bhat

25-1-06
Date

Article #4
Accord des coauteurs

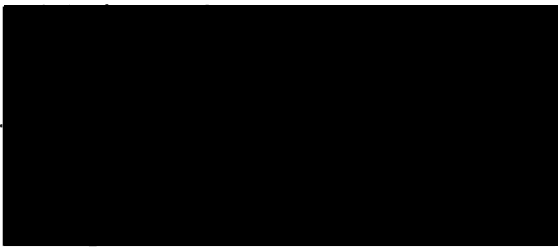
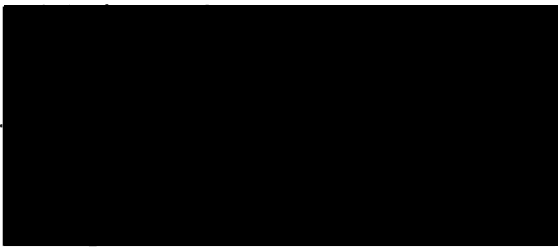
Hélène Brodeur
PhD Sciences biomédicales

Isomer-specific retinoic acid biosynthesis in HeLa cells expressing recombinant class I aldehyde dehydrogenase

Hélène Brodeur, Samuel Chagnon, Maxime Parisotto, Sylvie Mader, Pangala V. Bhat.

En préparation

À titre de coauteur de l'article identifié ci-dessus, je suis d'accord pour que **Hélène Brodeur** inclue cet article dans sa **thèse de doctorat** qui a pour titre **Étude du rôle des aldéhydes déshydrogénases de classe I dans la biosynthèse de l'acide rétinoïque**.

Samuel Chagnon	Date
	Date 21/01/06
	Date 21/01/06
Pangala V. Bhat	Date

Article #5
Accord des coauteurs

Hélène Brodeur
PhD Sciences biomédicales

Métabolisme des rétinoïdes et cancer

Maxime Parisotto, Hélène Brodeur, Pangala V. Bhat, Sylvie Mader.

Accepté dans :
Médecine/Sciences

À titre de coauteur de l'article identifié ci-dessus, je suis d'accord pour que **Hélène Brodeur** inclue cet article dans sa thèse de doctorat qui a pour titre **Étude du rôle des aldéhydes déshydrogénases de classe I dans la biosynthèse de l'acide rétinoïque**.


Maxime Parisotto

20/04/06
Date


Sylvie Mader

20/04/06
Date


Pangala V. Bhat

Date

Artile #5
Accord des coauteurs

Hélène Brodeur
PhD Sciences biomédicales

Métabolisme des rétinoïdes et cancer

Maxime Parisotto, Hélène Brodeur, Pangala V. Bhat, Sylvie Mader.

Accepté dans :
Médecine/Sciences

À titre de coauteur de l'article identifié ci-dessus, je suis d'accord pour que **Hélène Brodeur** inclue cet article dans sa **thèse de doctorat** qui a pour titre **Étude du rôle des aldéhydes déshydrogénases de classe I dans la biosynthèse de l'acide rétinoïque.**

Maxime Parisotto

Date

Sylvie Mader

Date


Pangala V. Bhat

09/20/06

Date

Article #5
Accord de l'éditeur

médecine/sciences

Éditeurs : La Société de la revue médecine/sciences

Titre : *Métabolisme des rétinoïdes et cancer*

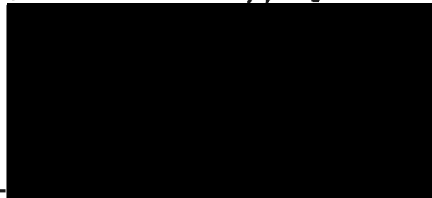
Auteurs : Maxime Parisotto, Hélène Brodeur,
Pangala V. Bhat, Sylvie Mader.

Accepté dans : médecine/sciences

L'étudiante **Hélène Brodeur** est autorisée à inclure l'article ci-dessus dans sa thèse de doctorat qui a pour titre **Étude du rôle des aldéhydes déshydrogénases de classe I dans la biosynthèse de l'acide rétinoïque.**

SRMS

Éditeur



Signature

2004-06

Date